(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105659089 B
(45)授权公告日 2019.02.15

(21)申请号 201480054148.1

(22)申请日 2014.07.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105659089 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(30)优先权数据
61/860,644 2013.07.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.03.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/048962 2014.07.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/017579 EN 2015.02.05

(73)专利权人 奥加诺沃公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 萨米尔·戴姆勒 克莱·普拉特
哈利·斯科特·拉波博特
瓦德里·乔什
莎伦·C·普雷斯内尔
基思·墨菲 小史蒂芬·潘托尼
弗朗克·林 维维安·戈尔根

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李慧慧 郑霞

(51)Int.Cl.
G01N 33/50(2006.01)
G01N 33/70(2006.01)

审查员 周洋

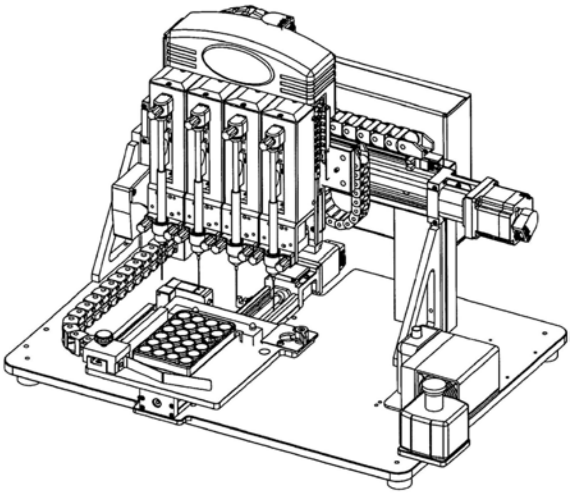
权利要求书3页 说明书50页 附图32页

(54)发明名称

用于组织的制造的自动化设备、系统和方法

(57)摘要

本文描述了对便于组织和器官制造过程的自动化的生物打印技术的改进。



1.一种自动化生物打印机,包括:

a.打印机头,其包括一个或多个料盒,每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物;以及

对于每个料盒:

i.料盒定位致动装置,其相对于接收表面垂直地定位所述料盒,以用所述料盒的所分配的内容物产生特定的三维几何形状,所述料盒定位致动装置独立于其它致动装置而操作;以及

ii.沉积孔口;

b.接收表面,其用于接收料盒的所分配的内容物;

c.校准装置,其包括三维校准系统,所述系统包括至少两个激光器、固定到所述接收表面用于确定所述沉积孔口的位置的顶端感测三角测量传感器;以及固定到所述打印机头用于确定所述接收表面的位置的表面感测三角测量传感器;由此,所述系统计算打印高度,所述打印高度包括在所述沉积孔口和所述接收表面之间的距离,其中所述沉积孔口和所述接收表面之间的所述距离能够被调节以校正表面高度变化;以及

d.用于在x轴和/或y轴中控制所述打印机头的位置的打印机头定位致动装置,所述打印机头定位致动装置独立于所述料盒定位致动装置而操作;

由此,结构被生物打印,而无需停止所述生物打印机以手动更换一个或多个料盒或手动调节所述打印机头的定位或所述一个或多个料盒的定位。

2.如权利要求1所述的自动化生物打印机,其中所述三维校准系统创建所述接收表面的形貌图。

3.如权利要求1所述的自动化生物打印机,其中所述三维校准系统创建所述沉积孔口的形貌图。

4.如权利要求1所述的自动化生物打印机,其中所述三维校准系统在料盒的所述内容物的沉积期间监控所述打印高度。

5.如权利要求1所述的自动化生物打印机,还包括至少一个印模,每个印模控制:

a.布置在图案中的多个结构的并行的同时沉积,每个结构具有特定的三维几何形状;

b.具有特定的三维几何形状的单个结构的沉积;或

c.其组合。

6.如权利要求1所述的自动化生物打印机,还包括用于控制具有特定的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴,其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力,有用于至少两种不同的材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端,所述多轴管具有核心层和套层,任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料,且所述材料选自生物油墨、支持材料及其组合。

7.如权利要求6所述的自动化生物打印机,其中所述一个或多个多轴喷嘴中的每个还包括独立地调节通过所述至少两个独立输出端的所述至少两种不同的材料中的每种材料的流量的装置。

8.如权利要求7所述的自动化生物打印机,其中独立地调节通过所述至少两个独立输出端的所述至少两种不同的材料中的每种材料的流量的装置允许连续挤压或喷溅挤压。

9.如权利要求6所述的自动化生物打印机,其中所述至少两种不同的材料中的一种材

料在生物打印之后被移除以产生一个或多个孔隙。

10.如权利要求1所述的自动化生物打印机,其中至少一个料盒还包括调节和/或维持所述料盒的温度的装置。

11.根据权利要求1所述的自动化生物打印机,包括:

a.打印机头,其包括至少三个料盒,其中

i.至少一个料盒包括包含生物油墨的毛细管;

ii.至少一个料盒包括包含生物油墨的针;

iii.至少一个料盒配置成用于喷墨打印。

12.如权利要求11所述的自动化生物打印机,其中所述针与生物油墨储器连通,生物油墨沉积是通过气动移位实现的,以及所述生物油墨是液态或半固态成分。

13.如权利要求11所述的自动化生物打印机,其中所述毛细管通过正位移机制沉积生物油墨,且所述生物油墨是固体或半固体成分。

14.如权利要求11所述的自动化生物打印机,还包括至少一个印模,每个印模控制:

a.布置在图案中的多个结构的并行的同时沉积,每个结构具有特定的三维几何形状;

b.具有特定的三维图案化的几何形状的单个结构的沉积;或

c.其组合。

15.如权利要求11所述的自动化生物打印机,还包括用于控制具有特定的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴,其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力,有用于至少两种不同的材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端,所述多轴管具有核心层和套层,任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料,且所述材料选自生物油墨、支持材料及其组合。

16.根据权利要求1所述的自动化生物打印机,还包括至少一个印模,每个印模控制:

a.布置在图案中的多个结构的并行的同时沉积,每个结构具有特定的三维几何形状;或者

b.具有特定的三维图案化的几何形状的单个结构的沉积。

17.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中所述印模被永久地固定。

18.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中所述印模被可逆地固定。

19.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中所述印模控制布置在图案中的2-384个结构的并行的同时沉积。

20.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中所述印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨、支持材料或其组合的一个或多个室。

21.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中所述印模控制多种材料的并行的同时沉积。

22.如权利要求21所述的自动化生物打印机,其中所述印模包括每种材料的输入口。

23.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中在所述多个结构中的每个结构具有相同的三维几何形状。

24.如权利要求16所述的自动化生物打印机,其中在所述多个结构中的每个结构彼此接触以形成单个结构。

25.如权利要求6所述的自动化生物打印机,其中所述多轴喷嘴中的一个或多个是同轴

喷嘴。

26.如权利要求6所述的自动化生物打印机，其中，每个多轴喷嘴具有在所述核心层和所述套层之间的一个或多个中间层。

27.如权利要求15所述的自动化生物打印机，其中，每个多轴喷嘴具有在所述核心层和所述套层之间的一个或多个中间层。

用于组织的制造的自动化设备、系统和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2013年7月31日提交的美国临时申请61/860,644的权益,该临时申请的内容特此通过引用被全部并入。

[0003] 发明背景

[0004] 医疗保健工业面临很多迫切的问题。在2013年6月,有大约118,000患者被器官共享联合网络(UNOS)登记为需要器官移植。在2013年1月和3月之间,只有6,891个移植被执行。每年,比被执行的移植更多的患者被添加到UNOS列表,导致等待移植的患者的数量的净增加。例如,在2011年,超过15,000个人被登记为需要肝嫁接/移植;然而,那年只有大约5,800个肝移植被执行。在2010年,肝的中位数等待时间是超过12个月。

[0005] 此外,新制药化合物的研究和开发成本是大约18亿美元。见Paul等人(2010)的How to improve R&D productivity:the pharmaceutical industry’s grand challenge(Nature Reviews Drug Discovery 9(3):203-214)。药物发现是药物被发现和/或设计的过程。药物发现的过程通常涉及至少下列步骤:候选物的识别、合成、特征鉴定、筛选和对治疗功效的分析。尽管关于生物系统的技术和理解有了发展,但是药物发现仍然是包括新治疗发现的低速率的冗长、昂贵和低效的过程。

[0006] 发明概述

[0007] 存在对便于应用再生医学和组织工程技术来减轻对组织和器官的紧急需要的工具和技术的需要。也存在对实质上增加创新的、成本有效的新机器的数量和质量而不引起无法承受的R&D成本的工具和技术的需要。发明人在本文描述对用于制造允许改进的速度、准确度和可扩性的组织和器官的设备、系统和方法的改进。具体地,所述设备、系统和方法提供的优点,包括但不限于,改进生产可扩性,同时维持对材料的空间取向的控制、沉积设备的改进的三维校准和多种不同的材料的改进的利用而没有制造过程的显著中断。

[0008] 在一个方面中,本文公开了自动化生物打印机,其包括:打印机头,其包括一个或多个料盒,每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物;以及对于每个料盒:相对于接收表面垂直地定位料盒用在料盒的所分配的内容物产生特定的三维几何形状的致动装置,致动装置独立于其它致动装置而操作;以及沉积孔口;用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面;以及包括三维校准系统的校准装置,该系统包括至少两个激光器,固定到接收表面用于确定沉积孔口的位置的传感器;以及固定到打印机头用于确定接收表面的位置的传感器;由此,系统计算打印高度,打印高度包括在沉积孔口和接收表面之间的距离;由此,结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换一个或多个料盒或手动调节打印机头的定位或一个或多个料盒的定位。在一些实施方式中,三维校准系统创建接收表面的形貌图(topographical map)。在一些实施方式中,三维校准系统创建沉积孔口的形貌图。在一些实施方式中,三维校准系统在料盒的内容物的沉积期间监控打印高度。在一些实施方式中,自动化生物打印机还包括至少一个印模,每个印模控制:布置在图案中的多个结构的并行的同时沉积,每个结构具有特定的三维几何形状;具有特定的三维几何形状的单个结构的沉积;或其组合。在一些实施方式中,自动化生物打印机还包括用于控制具有特定

的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴，其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力，有至少两种不同材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端，多轴管具有核心层和套层以及可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层，任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料，且材料选自生物油墨、支持材料及其组合。在另外的实施方式中，一个或多个多轴喷嘴中的每个还包括独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每个的流量的装置。在又一些其它实施方式中，独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每个的流量的装置允许连续挤压或喷溅挤压。在一些实施方式中，至少两种不同的材料中的一种材料在生物打印之后被移除以产生一个或多个孔隙。在一些实施方式中，至少一个料盒还包括调节和/或维持料盒的温度的装置。

[0009] 在另一方面中，本文公开了自动化生物打印机，其包括：打印机头，其包括至少三个料盒，其中(i)至少一个料盒包括包含生物油墨的毛细管；(ii)至少一个料盒包括包含生物油墨的针；(iii)至少一个料盒配置成用于喷墨打印；以及(iv)每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；以及用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；由此，结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换一个或多个料盒或手动调节打印机头的定位或一个或多个料盒的定位。在一些实施方式中，针与生物油墨储器连通，生物沉积是通过气动移位，以及生物油墨是液态或半固态成分。在一些实施方式中，毛细管通过正位移机制沉积生物油墨，且生物油墨是液态或半固态成分。在一些实施方式中，自动化生物打印机还包括校准装置，其包括三维校准系统，该系统包括至少两个激光器，固定到接收表面用于确定沉积孔口的位置的传感器；以及固定到打印机头用于确定接收表面的位置的传感器；由此，系统计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和接收表面之间的距离。在一些实施方式中，自动化生物打印机还包括至少一个印模，每个印模控制：布置在图案中的多个结构的并行的同时沉积，每个结构具有特定的三维几何形状；具有特定的三维几何形状的单个结构的沉积；或其组合。在一些实施方式中，自动化生物打印机还包括用于控制具有特定的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴，其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力，有至少两种不同材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端，多轴管具有核心层和套层以及可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层，任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料，且材料选自生物油墨、支持材料及其组合。在一些实施方式中，至少一个料盒还包括调节和/或维持料盒的温度的装置。

[0010] 在另一方面中，本文公开了自动化生物打印机，其包括：至少一个印模，每个印模控制：多个结构的并行的同时沉积并布置在图案中，每个结构具有特定的三维几何形状；具有特定的三维图案化的几何形状的单个结构的沉积；或其组合；由此，单个结构或多个结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换生物打印机的一个或多个部件或手动调节生物打印机的一个或多个部件的定位。在一些实施方式中，印模被永久地固定。在一些实施方式中，印模被可逆地固定。在一些实施方式中，印模控制2-384个结构的并行的同时沉积并布置在图案中。在一些实施方式中，印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨、支持材料或其组合的一个或多个室。在一些实施方式中，印模控制多种材料的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模包括每种材料的输入口。在一些实施方式中，在多个结构中的每个结构

具有相同的三维几何形状。在一些实施方式中，在多个结构中的每个结构彼此接触以形成单个结构。

[0011] 在另一方面中，本文公开了自动化生物打印机，其包括用于控制具有特定的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴，其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力，有至少两种不同材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端，多轴管具有核心层和套层以及可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层，任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料，且材料选自生物油墨、支持材料及其组合；由此，一个或多个结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换生物打印机的一个或多个部件或手动调节生物打印机的一个或多个部件的定位。在一些实施方式中，一个或多个多轴喷嘴中的每个还包括独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每个的流量的装置。在另外的实施方式中，独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每个的流量的装置允许连续挤压或喷溅挤压。在一些实施方式中，至少两种不同的材料中的一种材料在生物打印之后被移除以产生一个或多个孔隙。在一些实施方式中，一个或多个多轴喷嘴是同轴喷嘴。在一些实施方式中，一个或多个多轴喷嘴是三轴喷嘴。

[0012] 在另一方面中，本文公开了生物打印机，其包括：一个或多个打印机头，其中每个打印头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架，料盒支架可旋转以使选定料盒与驱动路径对准，每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物；用于分配选定料盒的内容物的驱动装置；用于接收选定料盒的所分配的内容物的接收表面；相对于接收表面定位一个或多个打印机头以用选定料盒的所分配的内容物产生特定的三维几何形状的致动装置；以及用于确定下列项的位置的校准装置：1)与选定料盒相关的沉积孔口；以及2)由接收表面支承的打印目标表面。在一些实施方式中，驱动装置利用正位移、气动位移、液压位移、声共振或其组合来分配料盒的内容物。在一些实施方式中，料盒支架接收并保持2-10个料盒。在一些实施方式中，每个打印机头包括每个料盒的沉积孔口。在一些实施方式中，每个打印机头包括多个料盒的公共沉积孔口。在一些实施方式中，多个料盒包括冲洗料盒以去除生物打印机的分配路径的污染。在一些实施方式中，接收表面相对于一个或多个打印机头移动以用多个料盒的所分配的内容物产生特定的三维几何形状。在一些实施方式中，至少一个料盒连接到内容物的远程储器。在一些实施方式中，至少一个料盒是可用后即可丢弃的单次使用料盒。在一些实施方式中，校准装置计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在另外的实施方式中，校准装置在材料的沉积期间监控打印高度。在一些实施方式中，校准装置利用从三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机选择的一个或多个传感器。在一些实施方式中，生物油墨包括哺乳动物细胞。

[0013] 在另一方面中，本文公开了生物打印机的料盒支架，料盒支架附接到生物打印机的可定位打印机头并适合于接收并保持多个料盒，每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物，料盒支架可旋转以使选定料盒与生物打印机的驱动路径对准，使得驱动机构啮合选定料盒以分配所述内容物。在一些实施方式中，料盒支架适合于接纳并保持2-10个料盒。

[0014] 在另一方面中，本文公开了自动化生物打印机的三维校准系统，该系统包括：固定到生物打印机的接收表面用于确定生物打印机的沉积孔口的位置的传感器；以及固定到生

物打印机的打印机头用于确定与接收表面相关的打印目标表面的位置的传感器；由此，系统计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在一些实施方式中，传感器选自三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机。

[0015] 在另一方面中，本文公开了生物打印机，其包括：打印机头，打印机头包括用于接收并保持料盒的装置，料盒包括从生物油墨和支持材料的一个或多个选择的内容物；用于分配料盒的内容物的驱动装置；用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；相对于接收表面定位打印机头的致动装置；以及用于控制多个结构的并行的同时沉积的印模，每个结构具有特定的三维几何形状。在一些实施方式中，驱动装置利用正位移、气动位移、液压位移、声共振或其组合来分配料盒的内容物。在一些实施方式中，打印机头包括料盒的沉积孔口。在一些实施方式中，接收表面相对于一个或多个打印机头移动以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状。在一些实施方式中，料盒连接到内容物的远程储器。在一些实施方式中，料盒是可用后即可丢弃的单次使用料盒。在一些实施方式中，生物打印机还包括用于确定下列项的位置的校准装置：1）与料盒相关的沉积孔口，以及2）由接收表面支承的打印目标表面。在另外的实施方式中，校准装置计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在又一些其它实施方式中，校准装置在材料的沉积期间监控打印高度。在另外的实施方式中，校准装置利用从三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机选择的一个或多个传感器。在一些实施方式中，印模被永久地固定。在一些实施方式中，印模被可逆地固定。在一些实施方式中，印模控制2-384个结构的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模控制96个结构的并行的同时沉积。在又一些另外的实施方式中，印模控制24个结构的并行的同时沉积。在又一些另外的实施方式中，印模控制12个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中，印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨或支持材料的室。在一些实施方式中，印模控制多种材料的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模包括每种材料的输入口。在一些实施方式中，在多个结构中的每个结构具有相同的三维几何形状。在一些实施方式中，生物油墨包括哺乳动物细胞。

[0016] 在另一方面中，本文公开了由本文所述的生物打印机制造的组织结构。

[0017] 在另一方面中，本文公开了用于控制从生物打印机沉积的材料的印模，印模包括：用于接收从生物打印机沉积的生物油墨或支持材料的一个或多个输入口；以及多个输出模具，每个输出模具包括用于使生物油墨或支持材料成形的与每个输入口相关的井；由此，印模允许多个结构的并行的同时沉积，每个结构具有特定的三维几何形状。在一些实施方式中，印模控制2-384个结构的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模控制96个结构的并行的同时沉积。在又一些其它实施方式中，印模控制24个结构的并行的同时沉积。在再一些其它实施方式中，印模控制12个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中，印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨或支持材料的室。在一些实施方式中，印模控制多种材料的并行的同时沉积。

[0018] 在另一方面中，本文公开了包括用于冲压或切割以使一个或多个三维生物打印的组织成形为期望的几何形状的一个或多个模具的印模。

[0019] 在另一方面中，本文公开了打印机头，其包括：多个料盒，每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；用于确定与每个料盒相关的沉积孔口的位置的校准装置；以及对于每个料盒：用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置；分配料盒

的内容物的驱动装置，驱动装置独立于其它驱动装置而操作；以及相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；假定打印机头用于生物打印机。在各种实施方式中，每个驱动装置利用正位移、气动位移、液压位移、声共振或其组合来分配料盒的内容物。

[0020] 在另一方面中，本文公开了生物打印机，其包括：打印机头，其包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架，每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；以及对于每个料盒：用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置；分配料盒的内容物的驱动装置，驱动装置独立于其它驱动装置而操作；相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；以及用于确定下列项的位置的校准装置：1)与每个料盒相关的沉积孔口；以及2)由接收表面支承的打印目标表面。在各种实施方式中，每个驱动装置利用正位移、气动位移、液压位移、声共振或其组合来分配料盒的内容物。

[0021] 附图的简要说明

[0022] 图1示出安装在水平位置上的激光距离传感器的非限制性例子。

[0023] 图2示出安装在垂直位置上的检测到毛细管的范围的激光距离传感器的非限制性例子。

[0024] 图3示出安装在水平位置上的检测到具有电线的毛细管的范围的激光距离传感器的非限制性例子。

[0025] 图4示出具有双传感器的全自动校准配置的非限制性示意性例子；在该示例中，示意图描绘安装到打印表面的顶端三角测量传感器和安装到泵压头的表面距离传感器，其中来自这两个传感器的信息用于使生物打印过程自动化。

[0026] 图5示出生物打印的组织结构的二维表示的非限制性例子。

[0027] 图6示出使用连接到具有510μm针的注射器的NovoGen MMX™生物打印机通过PF-127的连续沉积而产生的三维结构——这种情况下，金字塔形结构——的非限制性例子。

[0028] 图7示出使用连接到具有510μm针的注射器的NovoGen MMX™生物打印机通过PF-127的连续沉积而产生的三维结构——这种情况下，立方体形(左)结构和中空立方体形(右)结构——的非限制性例子。

[0029] 图8-1示出固定到沉积机构的两部分印模——在该示例中，控制所沉积的材料的几何形状以便于多个结构的并行沉积的印模——的非限制性例子；

[0030] 图8-2示出图8-1的两部分印模的非限制性示意性例子；在该示例中，示意图描绘附接到填充有形成均匀的一层生物油墨的细胞悬液的室的印模，其中生物油墨通过印模挤压出以形成连续中空圆柱形结构。

[0031] 图9-1示出旨在用于旋转包含生物油墨的料盒以增加来自悬液和兼容料盒的细胞浓缩物的离心装置的非限制性示意性例子；在该示例中示出了，(a)离心装置的透视图；(b)兼容料盒的透视图；以及(c)沿兼容料盒的A-A示意图。

[0032] 图9-2示出装载到挤压设备上的料盒的非限制性示意性例子。

[0033] 图9-3示出安装在料盒上的印模的非限制性例子，通过这个印模挤压出的生物油墨将形成六个连续中空圆柱形结构；在该示例中示出了，(a)具有所安装的印模的料盒的透

视图;(b)沿着安装有印模的料盒的B-B的示意图;以及(c)印模本身的三个不同的透视图。

[0034] 图10示出与标准24井板兼容的两种材料挤压板或模具盖的非限制性示意性例子。

[0035] 图11示出图10的挤压板的非限制性示意性例子;在该示例中,示意图描绘单独的几何模具,每个适合于将材料沉积到标准24井板的井内,以及连接到每个几何模具和材料输入口的通道。

[0036] 图12示出图10的模具盖的非限制性示意性例子;在该示例中,示意图描绘单独的几何模具,每个适合于将两种不同的材料沉积到特定的几何结构内。

[0037] 图13示出具有包括多个打印料盒的两个打印机头的生物打印机的非限制性例子,每个料盒包含用于沉积的不同材料;在该示例中,每个打印机头对每个料盒利用单独的沉积顶端。

[0038] 图14示出具有包括多个打印料盒的两个打印机头的生物打印机的非限制性例子,每个料盒包含用于沉积的不同材料;在该示例中,每个打印机头对多个料盒利用公共沉积顶端。

[0039] 图15示出具有两个打印机头的生物打印机的非限制性例子,打印机头之一连接到单个容器形式的远程储器;在该示例中,打印机头利用单沉积顶端。

[0040] 图16示出塑料注射器形式的用后即可丢弃的单次使用生物油墨料盒的非限制性例子;在该示例中,示出了分解图。

[0041] 图17示出被配置为喷墨头的部分的料盒的非限制性例子;在该示例中,在分解图中,喷墨头包括具有注射器柱塞的注射器主体、注射器适配器、用于喷墨头的支架、耦合到高精度分配顶端的喷墨阀、在注射器适配器和喷墨阀之间的连接元件以及喷墨阀保持架。

[0042] 图18示出具有两个打印机头的生物打印机的非限制性例子;在该示例中,每个打印头接收来自储器的生物油墨。

[0043] 图19示出描绘用于在生物打印机的背景中将UV交联材料暴露于UV光源的示例性参数的非限制性示意图。

[0044] 图20示出包括UV模块的NovoGen MMX^{TM}生物打印机的非限制性例子;在该示例中,打印机头定位成使得毛细管部分地被插入到UV模块。

[0045] 图21示出包括UV模块的NovoGen MMX^{TM}生物打印机的非限制性例子;在该示例中,打印机头定位成使得毛细管全部被插入到UV模块。

[0046] 图22示出非限制性示例性打印机头;在该示例中,具有四个料盒的打印机头,其中每个料盒包括其自己的沉积顶端并具有相对于其它料盒的独立z轴(例如垂直)运动以及分配料盒的内容物的独立驱动机构。

[0047] 图23a示出具有独立z轴运动的打印机头的非限制性例子;在该示例中,打印机头具有调节所附接的料盒相对于目标打印表面的位置的z轴定位机构以及分配所附接的料盒的内容物的驱动机构。

[0048] 图23b示出调节所附接的料盒相对于图23a所示的打印机头的目标打印表面的位置的z轴定位机构的非限制性例子。

[0049] 图24a示出没有料盒和分配顶端的图23a和图23b的非限制性例子。

[0050] 图24b示出图23a和图23b的非限制性例子;在该示例中示出了,定制射流台和高精度线性台的内部视图被示出。

[0051] 图25示出图23b的z轴定位机构的非限制性例子；在该示例中，安装板与光学中断传感器和定制传感器托架一起被示出。

[0052] 图26示出具有图22的打印机头的生物打印机的非限制性例子。

[0053] 图27示出包括控制注射器温度的装置的打印机头的非限制性例子；在这个例子中，(a)打印机头被显示具有在注射器周围的热交换护层；(b)在注射器周围的热交换护层在打印头缺乏的情况下被显示；以及(c)在注射器周围的热交换护层的示意图被示出。

[0054] 图28示出通过同轴喷嘴的挤压的非限制例子；在该示例中，核心层的溅射挤压与套层的同时连续挤压一起导致分段同轴管，其在段之间随后被切断以形成球形“类器官”。

[0055] 图29示出同轴喷嘴的规定的非限制性例子。

[0056] 图30示出具有包含细胞的核心层和从同轴喷嘴突出的无细胞套层的同轴管的非限制性例子；在该示例中，横截面的组织结构示出紧凑的细胞核心结构。

[0057] 图31示出使用50:50正常人肺成纤维细胞:人肺内皮细胞的六天老的生物打印的脉管壁血管的非限制性例子；在这个例子中，血管的CD31染色横截面的两个单独的视图显示几乎所有内皮细胞到血管的内腔的迁移。所有定标线条表示200微米。

[0058] 图32示出使用I-生物油墨的同轴结构的非限制性例子；在该示例中，嵌入式管状结构和周围水凝胶的组织结构被观察到。

[0059] 图33示出使用I-生物油墨创建的补片的非限制性例子；在该示例中，示出了使用H和E染色的组织结构。

[0060] 图34示出生物打印结构的非限制性例子，一些生物打印结构包括I-生物油墨(以较暗的阴影示出)；在该示例中，(a)示出球体或圆柱体；(b)示出同轴圆柱体；(c)示出同轴球体；以及(d)从I生物油墨和正常生物油墨(没有免疫调节细胞的生物油墨)得到复杂结构。

[0061] 本发明的详细描述

[0062] 本发明涉及再生医学、组织/器官工程、生物和医学研究和药物发现的领域。更具体地，本发明涉及用于制造组织和器官的改进的设备、用于校准并使用这样的设备的系统和方法以及由本文公开的设备、系统和方法制造的组织和器官。作为例子，本文所述的设备、系统和方法提供对生产的可扩性的明显改进，同时通过使用印模和附接到允许并行地生物打印多个结构的生物打印机的模具装置维持在材料的空间定位中的准确度。作为另一例子，本文所述的设备、系统和方法通过使用传感器来提供对沉积设备的三维校准的明显改进以快速和准确地确定材料沉积孔口和目标打印表面的相对位置，其包括在打印表面之上的沉积孔口的高度。作为又一例子，本文所述的设备、系统和方法通过在不执行更换操作的情况下使用交换打印料盒的装置并通过引入用后即可丢弃的单次使用打印料盒来提供对具有多种不同的材料的组织制造的明显改进。

[0063] 在某些实施方式中，本文公开了自动化生物打印机，其包括：打印机头，其包括一个或多个料盒，每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；以及对于每个料盒：相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；以及沉积孔口；用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；以及包括三维校准系统的校准装置，该系统包括至少两个激光器：固定到接收表面用于确定沉积孔口的位置的传感器；以及固定到打印机头用于确定接

收表面的位置的传感器;由此,系统计算打印高度,打印高度包括在沉积孔口和接收表面之间的距离;由此,结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换一个或多个料盒或手动调节打印机头的定位或一个或多个料盒的定位。

[0064] 在某些实施方式中,本文也公开了自动化生物打印机,其包括:打印机头,其包括至少三个料盒,其中(i)至少一个料盒包括包含生物油墨的毛细管;(ii)至少一个料盒包括包含生物油墨的针;(iii)至少一个料盒配置成用于喷墨打印;以及(iv)每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物;以及用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面;由此,结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换一个或多个料盒或手动调节打印机头的定位或一个或多个料盒的定位。

[0065] 在某些实施方式中,本文也公开了自动化生物打印机,其包括:至少一个印模,每个印模控制:多个结构的并行的同时沉积并布置在图案中,每个结构具有特定的三维几何形状;具有特定的三维图案化的几何形状的单个结构的沉积;或其组合;由此,单个结构或多个结构被生物打印,而不停止生物打印机以手动更换生物打印机的一个或多个部件或手动调节生物打印机的一个或多个部件的定位。

[0066] 在某些实施方式中,本文也公开了自动化生物打印机,其包括用于控制具有特定的三维几何形状的一个或多个结构的沉积的一个或多个多轴喷嘴,其中每个多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力,有至少两种不同材料的至少两个独立输入端和用于多轴管的制备的至少两个独立输出端,多轴管具有核心层和套层以及可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层,任何两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料,且材料选自生物油墨、支持材料及其组合;由此,一个或多个结构被生物打印而不停止生物打印机以手动更换生物打印机的一个或多个部件或手动调节生物打印机的一个或多个部件的定位。

[0067] 在某些实施方式中,本文还公开了生物打印机,其包括:一个或多个打印机头,其中每个打印机头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架,料盒支架可旋转以使选定料盒与驱动路径对准,每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物;用于分配选定料盒的内容物的驱动装置;用于接收选定料盒的所分配的内容物的接收表面;用于相对于接收表面定位一个或多个打印机头以用选定料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置;以及用于确定下列项的位置的校准装置:1)与选定料盒相关的沉积孔口;以及2)由接收表面支承的打印目标表面。

[0068] 在某些实施方式中,本文还公开了生物打印机的料盒支架,料盒支架附接到生物打印机的可定位打印机头并适合于接收并保持多个料盒,每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物,料盒支架可旋转以使选定料盒与生物打印机的驱动路径对准,使得驱动机构啮合选定料盒以分配所述内容物。

[0069] 在某些实施方式中,本文也公开了自动化生物打印机的三维校准系统,该系统包括:固定到生物打印机的接收表面用于确定生物打印机的沉积孔口的位置的传感器;以及固定到生物打印机的打印机头用于确定与接收表面相关的打印目标表面的位置的传感器;由此,系统计算打印高度,打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。

[0070] 在某些实施方式中,本文也公开了生物打印机,其包括:打印机头,打印机头包括用于接收并保持料盒的装置,料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物;用于分配料盒的内容物的驱动装置;用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面;用于

相对于接收表面定位打印机头的致动装置；以及用于控制多个结构的并行的同时沉积的印模，每个结构具有特定的三维几何形状。

[0071] 在某些实施方式中，本文也公开了由本文所述的生物打印机制造的组织结构。

[0072] 在某些实施方式中，本文也公开了用于控制从生物打印机沉积的材料的印模，印模包括：用于接收从生物打印机沉积的生物油墨或支持材料的一个或多个输入口；以及多个输出模具，每个输出模具包括用于使生物油墨或支持材料成形的与每个输入口相关的井；由此，印模允许多个结构的并行的同时沉积，每个结构具有特定的三维几何形状。

[0073] 在某些实施方式中，本文也公开了打印机头，其包括：多个料盒，每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；用于确定与每个料盒相关的沉积孔口的位置的校准装置；以及对于每个料盒：用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置；分配料盒的内容物的驱动装置，驱动装置独立于其它驱动装置而操作；以及相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；假定打印机头用于生物打印机。

[0074] 在某些实施方式中，本文也公开了生物打印机，其包括：打印机头，其包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架，每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物；以及对于每个料盒：用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置；分配料盒的内容物的驱动装置，驱动装置独立于其它驱动装置而操作；相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；以及用于确定下列项的位置的校准装置：1）与每个料盒相关的沉积孔口；以及2）由接收表面支承的打印目标表面。

[0075] 某些定义

[0076] 除非另外规定，本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。在本文提到的所有公布物、专利申请、专利和其它参考资料通过引用被全部并入。

[0077] 如在这个说明书和所附权利要求中使用的，除非上下文另外清楚地规定，单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数引用。因此例如，对“核酸”的引用包括一个或多个核酸和/或在阅读本公开时将对本领域中的技术人员变得明显的本文所述的类型的成分等。在本文对“或(or)”的任何引用旨在包括“和/或(and/or)”，除非另有规定。

[0078] 如在本文使用的，“同种异体移植(allograft)”意指从与接收者相同的种类的在遗传上不相同的成员得到的器官或组织。

[0079] 如在本文使用的，“生物油墨(bio-ink)”意指包括多个细胞的液体、半固体或固体成分。生物油墨具有高细胞密度或天然型细胞密度。在一些实施方式中，生物油墨本质上由细胞组成。在一些实施方式中，生物油墨包括细胞溶液、细胞聚集体、包括细胞的凝胶、多细胞体或组织。在一些实施方式中，生物油墨此外包括支持材料。在一些实施方式中，生物油墨此外包括提供实现生物打印的特定生物力学特性的非细胞材料。

[0080] 如在本文使用的，“生物打印(bioprinting)”意指通过与自动化计算机辅助三维原型模拟设备(例如生物打印机)兼容的方法来利用细胞(例如细胞溶液、包含细胞的凝胶、细胞悬液、细胞浓缩物、多细胞聚集体、多细胞体等)的三维精确沉积。

[0081] 如在本文使用的，“料盒(cartridge)”意指能够接收(并保持)生物油墨或支持材

料的任何对象。

[0082] 如在本文使用的，“计算机模块(computer module)”意指与较大的计算机系统交互作用的软件部件(包括代码段)。在一些实施方式中，软件模块(或程序模块)以文件的形式出现，且一般处理在较大的软件系统内的特定任务。在一些实施方式中，模块被包括在一个或多个软件系统中。在其它实施方式中，模块与一个或多个其它模块一起无缝集成到一个或多个软件系统内。计算机模块可选地是独立的代码段，或可选地不是单独可识别的代码。计算机模块的关键特征是，它允许最终用户使用计算机来执行所识别的功能。

[0083] 如在本文使用的，“可移植的(implantable)”意指生物相容的并能够暂时或实质上永久地被插入或移植到活有机体内或固定到活有机体上。

[0084] 如在本文使用的，“器官(organ)”意指接合到结构单元中以提供常见功能的组织的集合。器官的例子包括但不限于皮肤、汗腺、皮脂腺、乳腺、骨骼、脑、丘脑下部、脑下垂体、松果体、心脏、血管、喉头、气管、支气管、肺、淋巴管、唾液腺、粘膜腺、食道、胃、胆囊、肝、胰腺、小肠、大肠、结肠、尿道、肾、肾上腺、耳道、输尿管、膀胱、输卵管、子宫、卵巢、睾丸、前列腺、甲状腺、副甲状腺、睑板腺、腮腺、扁桃腺、腺状肿、胸腺和脾脏。

[0085] 如在本文使用的，“患者(patient)”意指任何个体。该术语与“受试者”、“接收者”和“捐赠者”可互换。这些术语中没有一个应被解释为需要医学专业人员(例如医师、护士、护士从业者、医师的助手、护理员、医院工人、社会工作者、临床研究院等)或科学研究者的监督(咨询或其它)。

[0086] 如在本文使用的“干细胞(stem cell)”意指展示潜能和自我更新的细胞。干细胞包括但不限于全能细胞、多能细胞、多能性系统、寡能细胞、单能细胞和祖细胞。干细胞可选地是胚胎干细胞、围肠干细胞、成体干细胞、羊膜干细胞和感应多能干细胞。

[0087] 如在本文使用的，“组织(tissue)”意指细胞的聚集体。组织的例子包括但不限于结缔组织(例如网形结缔组织、致密结缔组织、弹性组织、网状结缔组织和脂肪组织)、肌肉组织(例如骨骼肌、平滑肌和心肌)、泌尿生殖组织、胃肠组织、肺组织、骨组织、神经组织和上皮组织(例如单层上皮和复层上皮)、内胚层衍生的组织、中胚层衍生的组织和外胚层衍生的组织。

[0088] 如在本文使用的“异种移植(xenograft)”意指从与接收者不同的物种得到的器官或组织。

[0089] 器官移植的当前方法

[0090] 目前，没有用于重新器官合成的可靠方法。器官只从(例如肾和肝捐赠的)活捐赠者、(例如肺和心脏捐赠的)死亡的捐赠者和在几种情况下从动物(例如猪心瓣膜)得到。因此，需要器官移植的患者必须等待捐赠者器官变得可得到。这导致可用器官的短缺。此外，对从活有机体得到的器官的依赖性增加了移植排斥的机会。

[0091] 移植排斥

[0092] 在某些实例中，接收器官移植的患者经历过急性排斥。如在本文使用的，“过急性排斥(hyperacute reject)”意指从接收者的预先存在的抗体产生的对捐赠者的器官的补体介导免疫反应。过急性排斥出现在数分钟内并且其特征在于血凝集。如果移植的器官不被立即移除，则患者可能变成脓毒性的。异种移植将产生过急性排斥，除非接收者首先被施用免疫抑制剂。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不包括任何抗原，且因此不能

被接收者的任何抗体识别。

[0093] 在某些实例中，接收器官移植的患者经历急性排斥。如在本文使用的，“急性排斥(actute rejection)”意指在移植之后大于一星期到在移植之后大约一年开始的免疫反应。急性排斥是由于在捐赠者器官上的外来HLA分子的存在而导致的。在某些实例中，APC识别外来HLA并激活辅助T细胞。在某些实例中，辅助T细胞激活细胞毒素T细胞和巨噬细胞。在某些实例中，细胞毒素T细胞和巨噬细胞的存在导致具有外来HLA的细胞的死亡和因而所移植的器官的损害(或死亡)。急性排斥出现在大约60-75％的肾移植和50-60％的肝移植中。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不包括任何HLA，且因而将不导致辅助T细胞的激活。

[0094] 在某些实例中，接收器官移植的患者经历慢性排斥。如在本文使用的“慢性排斥(chronic rejection)”意指从抵抗所移植的组织的慢性炎症和免疫反应产生的移植排斥。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不包括任何抗原或外来HLA，且因此将不诱发炎症或免疫反应。

[0095] 在某些实例中，接收器官移植的患者经历慢性同种异体移植血管病(CAV)。如在本文使用的“慢性同种异体移植血管病(chronic allograft vasculopathy)”意指从所移植的器官的内部血管的纤维化产生的在所移植的器官中的功能的损失。在某些实例中，CAV是对所移植的器官的长期免疫反应的结果。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不包括任何抗原或外来HLA，且因此将不导致免疫反应。

[0096] 为了避免移植排斥，器官接收者被施用免疫抑制剂药物。免疫抑制剂包括但不限于皮质类固醇(例如强的松和氢化可的松)、钙调磷酸酶抑制剂(例如环胞多肽和他克莫司)、抗增生剂(例如硫唑嘌呤和霉酚酸)、抵抗免疫系统的特定组成部分的抗体(例如巴利昔单抗、达克珠单抗、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)和抗淋巴细胞球蛋白(ALG)和mTOR抑制剂(例如西罗莫司和依维莫司))。然而，免疫抑制剂具有几个消极的副作用，包括但不限于对感染(例如由卡氏肺囊虫性肺炎(PCP)、巨细胞病毒肺炎(CMV)、单纯疱疹病毒和带状疱疹病毒引起的感染)的易感性和恶性细胞的扩散、高血压、脂肪代谢障碍、高血糖、消化性溃疡、肝和肾伤害以及与其它药物的交互作用。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不导致免疫反应，且因此将不需要免疫抑制剂的施用。

[0097] 感染

[0098] 在某些实例中，捐赠者器官可能受传染物感染。在被感染的器官的移植之后，传染物能够遍及捐赠者扩散(部分地由于免疫抑制剂药物的使用)。作为非限制性的例子，接收者从所移植的器官感染HIV、西尼罗病毒、狂犬病、丙型肝炎、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、肺结核、恰加斯氏病和克罗伊茨菲尔德-雅各布二氏病。虽然这样的感染罕见，它们仍然可出现——死亡的捐赠者的社会史常常不准确，因为它们必须从最近的亲属得到，血清测试可产生假阴性结果，如果血清转化没有出现，或血清测试也可由于在输血之后的血液稀释而产生假阴性。此外，很多罕有的传染物由于所得到的器官能存活的有限时间而没有被筛选。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官将不包括任何传染物。

[0099] 捐赠者并发症

[0100] 作为捐赠器官的结果，活捐赠者也可经历并发症。这些并发症包括医院感染、对麻醉的过敏反应和手术错误。此外，器官捐助者可能有一天发现他们需要他们捐赠的器官。例

如，肾捐赠者的剩余的肾或肝捐赠者的剩余的叶可能被损坏。在一些实施方式中，重新制造的组织或器官消除了对捐赠者器官的需要，并因此将避免对捐赠者的消极副作用。

[0101] 鉴于可用器官的短缺和可伴随捐赠者器官移植的所有并发症，存在对重新制造组织和器官的方法的需要。

[0102] 组织工程

[0103] 组织工程是朝着生物代用品的发展来应用并组合工程和生命科学的原理的跨学科领域，生物代用品通过器官或组织的加强、修复或更换来恢复、维持或改进组织功能。经典组织工程的基本方法是将活细胞种植到生物相容和最终生物可降解环境(例如支架)内，并接着在生物反应器中培养这个结构，使得初始细胞群体可进一步扩大并成熟以在植入时产生目标组织。在模仿生物细胞外基质(ECM)的适当的支架的情况下，发展的组织可在活体外和活体内成熟之后采用期望器官的形式和功能。然而，由于控制在整个支架中的细胞的分布和空间布置的有限能力，实现具有天然组织状架构的足够高的细胞密度是有挑战性的。这些限制可导致具有差的机械特性和/或足够的功能的组织或器官。存在关于支架的生物降解、残余聚合物的截留和制造过程的工业按比例扩大的额外的挑战。尝试了无支架方法。当前无支架方法受到几个限制：

[0104] •复杂几何结构，例如多层结构，其中每层包括不同的细胞类型，可能需要在特定的架构内的细胞类型的决定性高分辨率放置以可再生产地实现天然细胞状结果。

[0105] •规模和几何形状被用于营养供给的功能血管网络的扩散和/或要求限制。

[0106] •组织的生存能力可能被限制扩散并限制细胞对营养物的接近的约束材料危害。

[0107] 在某些实施方式中，本文公开了产生三维组织结构的设备、系统和方法。在本文公开的设备、系统和方法利用三阶段过程：(i)预处理或生物油墨制备，(ii)处理，即生物油墨颗粒通过生物打印机实际自动输送/打印到生物纸内，以及(iii)后处理，即在生物反应器中的所打印的结构的成熟/培养。最终结构形成经由生物油墨颗粒的熔化在后处理期间发生。本文公开的设备、系统和方法具有下面的优点：

[0108] •它们能够产生包括细胞的组织和/或器官。

[0109] •它们通过利用发育生物系的原理来模仿天然组织形成过程的环境。

[0110] •它们可实现广泛的一系列复杂拓扑(例如多层结构、重复的几何图案、段、薄片、管、囊等)。

[0111] •它们与自动化制造装置兼容并且是可升级的。

[0112] 生物打印实现产生包括细胞的可移植组织的改进的方法，其在组织修复、组织加强、组织更换和器官更换中是有用的。此外，生物打印实现产生微观组织类似物——包括对活体外化验有用的类似物——的改进的方法。

[0113] 生物打印

[0114] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的设备、系统和方法。在一些实施方式中，设备是生物打印机。在一些实施方式中，方法包括生物打印技术的使用。在另外的实施方式中，通过使用本文所述的设备、系统和方法制造的组织和器官被生物打印。

[0115] 在一些实施方式中，使用利用基于细胞的三维自动化计算机辅助沉积——包括细胞溶液、细胞悬液、包含细胞的凝胶或糊状物、细胞浓缩物、多细胞体(例如圆柱体、球状体、带状物等)和支持材料——的快速原型模拟技术的方法由三维输送设备(例如生物打印机)

将生物打印的细胞结构、组织和器官制造到生物相容表面(例如由水凝胶和/或多孔膜组成)上。如在本文所使用的,在一些实施方式中,术语“工程化的(engineered)”当用于指组织和/或器官时意指细胞、细胞溶液、细胞悬液、包含细胞的凝胶或糊状物、细胞浓缩物、多细胞聚集体及其层被定位成由计算机辅助设备(例如生物打印机)根据计算机代码形成三维结构。在另外的实施方式中,计算机脚本例如是一个或多个计算机程序、计算机应用或计算机模块。在又一些另外的实施方式中,三维组织结构通过类似于在早期形态发生中的自组装现象的细胞或多细胞体的打印后熔化来形成。

[0116] 虽然多种方法——包括手动放置——可用于将细胞、多细胞聚集体和/或其层布置在生物相容表面上以产生三维结构,但是通过自动化计算机辅助机器例如生物打印机来定位是有利的。使用这种技术进行细胞或多细胞体的输送的优点包括细胞或多细胞体的快速、准确和可再生产的放置以产生展示具有各种成分的细胞、多细胞聚集体和/或其层的规划或预先确定的方位或模式的结构。优点还包括被保证的高细胞密度,同时最小化细胞损坏。

[0117] 在一些实施方式中,生物打印的方法是连续的和/或实质上连续的。连续生物打印方法的非限制性例子是经由连接到生物油墨的储器的分配顶端(例如注射器、毛细管等)从生物打印机分配生物油墨。在另外的非限制性实施方式中,连续生物打印方法是将生物油墨分配在功能单元的重复模式中。在各种实施方式中,重复的功能单元具有任何适当的几何形状,包括例如圆形、正方形、矩形、三角形、多边形和不规则几何形状。在另外的实施方式中,生物打印的功能单元的重复图案包括一层,且多个层相邻地被生物打印(例如堆叠)以形成工程组织或器官。在各种实施方式中,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多层相邻地被生物打印(例如堆叠)以形成工程组织或器官。

[0118] 在一些实施方式中,生物打印的功能单元以棋盘格形图案重复。“棋盘格形图案(tessellated pattern)”是填充平面而没有重叠和没有间隙的图的平面。连续和/或棋盘格形生物打印的优点可包括生物打印的组织的增加的生产。增加的生产可包括实现增加的规模、增加的复杂性或生产的减少的时间或成本。另一非限制性潜在优点可以是减少完成三维结构的生物打印所需的校准事件的数量。连续生物打印也便于可选地使用注射器机构从生物油墨的大储器打印较大的组织。

[0119] 在连续生物打印中的方法可选地涉及独立地或相对于彼此优化和/或平衡参数,例如打印高度、泵速、机器人速度或其组合。在一个例子中,用于沉积的生物打印机头速度是3mm/s,分配高度对第一层是0.5mm,且分配高度对每个随后的层增加0.4mm。在一些实施方式中,分配高度大约等于生物打印机分配顶端的直径。没有限制地,适当和/或最佳分配距离不导致材料变平或粘附到分配针。在各种实施方式中,生物打印机分配顶端具有大约20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000μm或更大的内径,包括其中的增量。在各种实施方式中,生物打印机的生物油墨储器具有大约5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100立方厘米或更大的容积,包括其中的增量。当聚积在系统中的残余压力低时,泵速可以是适当和/或最佳的。有利的泵速可取决于在储器的横截面面积和分配针之间的比,比越大需要越低的泵速。在一些实施方式中,适当和/或最佳打印速度实现均匀线的沉积而不影响材料的机械整体性。

[0120] 在一些实施方式中，生物打印的功能单元是包括核心层、套层和可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层的多轴管。在一些实施方式中，生物打印的功能单元是三轴管。

[0121] 在一些实施方式中，生物打印的功能单元是同轴管。在某些实施方式中，同轴管包括核心层(内层)和套层(外层)。在某些实施方式中，核心层的生物油墨不同于套层的生物油墨，且因而产生的同轴管是具有双层形态的圆柱体。在某些实施方式中，核心层的生物油墨只包括非细胞组分并可在生物打印之后被移除，且因而产生的同轴管是中空圆柱体。在其它实施方式中，核心层被非连续生物打印在“溅射核心馈送”模式中，而套层被连续地生物打印(见图28)。核心层的溅射挤压与套层的伴随的连续挤压一起产生分段同轴管。分段同轴管的随后操纵可导致套层沿着缺少核心层的区塌缩到本身上。在这些塌缩的区处切断每个段产生具有不同的套层和核心结构的圆球体或类器官。

[0122] 在一些实施方式中，生物打印的方法是非连续的和/或实质上非连续的。非连续生物打印方法的非限制性例子是经由作为喷墨打印头的部分的料盒从生物打印机分配生物油墨。在一些实施方式中，喷墨头包括高精度分配顶端和紧密地耦合到注射器泵的喷墨电磁阀。在一些实施方式中，分配容积由注射器压力、阀致动时间或高精度分配顶端或其任何组合控制。在一些实施方式中，分配容积由注射器压力、阀致动时间和高精度分配顶端控制。在各种实施方式中，喷墨分配容积是每液滴10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200微微升或更多，包括其中的增量。在一些实施方式中，通过使用外部加压储器来执行批量分配。

[0123] 本文公开的发明包括商业方法。在一些实施方式中，本文公开的设备和方法的速度和可升级性用于设计、构建和操作用于工程组织和/或器官的生产的工业和/或商业设施。在另外的实施方式中，工程组织和/或器官被生产、存储、分配、上市、做广告和出售，作为用于例如组织损坏、组织疾病和/或器官故障的医学治疗的材料、工具和成套工具或进行生物化验和/或药物筛选作为服务的材料、工具和成套工具。

[0124] 生物打印机

[0125] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，生物打印机是使生物打印过程自动化的任何仪器。在某些实施方式中，本文公开的生物打印机包括：打印机头，其包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架，每个料盒包括从生物油墨、支持材料和其组合选择的内容物；以及对于每个料盒：用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置；分配料盒的内容物的驱动装置，驱动装置独立于其它驱动装置而操作；以及相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置，致动装置独立于其它致动装置而操作；用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；以及用于确定下列项的位置的校准装置：1)与每个料盒相关的沉积孔口；以及2)由接收表面支承的打印目标表面。在某些实施方式中，本文公开的生物打印机包括：一个或多个打印机头(也被称为打印头)，其中打印机头包括用于接收并保持至少一个料盒的装置，以及其中所述料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物；用于校准至少一个料盒的位置的装置；以及用于分配至少一个料盒的内容物的装置。在某些实施方式中，本文公开的生物打印机包括：一个或多个打印机头，其中每个打印机头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架，料盒支架可旋转以使选定料盒与驱动路径对准，

每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物；用于分配选定料盒的内容物的驱动装置；用于相对于接收表面定位一个或多个打印机头以用选定料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置；以及用于确定下列项的位置的校准装置：1)与选定料盒相关的沉积孔口；以及2)由接收表面支承的打印目标表面。在某些实施方式中，本文公开的生物打印机包括：打印机头，打印机头包括用于接收并保持料盒的装置，料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物；用于分配料盒的内容物的驱动装置；用于接收料盒的所分配的内容物的接收表面；用于相对于接收表面定位打印机头的致动装置；以及用于控制多个结构的并行的同时沉积的印模，每个结构具有特定的三维几何形状。

[0126] 在各种实施方式中，生物打印机在二维或三维中的预先确定的几何结构(例如位置、图案等)中分配生物油墨和/或支持材料。在一些实施方式中，生物打印机通过相对于适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面移动打印机头来实现特定的几何形状。在其它实施方式中，生物打印机通过相对于打印机头移动打印机台或接收表面来实现特定的几何形状。在另外的实施方式中，生物打印机通过相对于一个或多个打印机头移动接收表面来实现特定的三维几何形状。在一些实施方式中，生物打印机通过相对于适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面移动打印机头并通过相对于打印机头移动打印机台或接收台来实现特定的几何形状。在某些实施方式中，生物打印机被维持在无菌环境中。

[0127] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括一个或多个打印机头。在另外的实施方式中，打印机头包括用于接收并保持至少一个料盒的装置。在一些实施方式中，打印机头包括每个料盒的沉积孔口。在一些实施方式中，料盒连接到内容物的远程储器。在一些实施方式中，料盒是用后即丢弃的单次使用料盒。在一些实施方式中，打印机头包括用于接收并保持多于一个料盒的装置。在一些实施方式中，用于接收并保持至少一个料盒的装置选自磁吸引、套爪卡盘夹、金属箍、螺母、桶适配器或其组合。在一些实施方式中，用于接收并保持至少一个料盒的装置是套爪卡盘夹。在一些实施方式中，打印机头包括用于相对于接收表面进行打印机头的z轴定位的独立致动装置。在一些实施方式中，打印机头还包括独立的装置以调节和/或维持打印机头、料盒和/或沉积孔口的温度。在另外的实施方式中，打印机头包括在料盒周围的热交换器护层以允许冷却剂流动，其中外部设备调节温度和冷却剂到打印机头的流动。在其它实施方式中，打印机头包括在料盒周围的热交换器护层以允许加热液体流动，其中外部设备调节温度和加热液体到打印机头的流动。

[0128] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括一个或多个打印机头，其中每个打印机头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架。在另外的实施方式中，料盒支架接收并保持任何适当数量的料盒。在各种实施方式中，料盒支架适当地接收并保持大约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个料盒。在一些实施方式中，料盒支架接收并保持大约2到大约10个料盒。在另外的实施方式中，每个打印机头包括每个料盒的沉积孔口。在其它实施方式中，每个打印机头包括多个料盒的公共沉积孔口。在一些实施方式中，多个料盒包括冲洗料盒以除去生物打印机的分配路径的污染。在某些实施方式中，生物打印机还包括相应的冲洗台以提供使用过的冲洗介质被存储的地方。在一些实施方式中，至少一个料盒连接到内容物的远程储器。在一些实施方式中，至少一个料盒是用后即丢弃的单次使用料盒。在一些实施方式中，打印机头包括用于相对于接收表面对打印机头进

行z轴定位的独立致动装置。在一些实施方式中，打印机头还包括调节和/或维持打印机头、料盒和/或沉积孔口的温度的独立装置。

[0129] 参考图13，在特定的实施方式中，生物打印机具有两个打印机头，每个打印机头包括每个附接的料盒的沉积孔口。

[0130] 参考图14，在特定的实施方式中，生物打印机具有两个打印机头，包括附接的多个料盒的公共沉积孔口。

[0131] 参考图15，在特定的实施方式中，生物打印机具有两个打印机头，且材料的远程储器连接到两个打印机头中的一个打印机头。储器的使用可选地由电子、气动或机械信令控制。

[0132] 参考图18，在特定的实施方式中，生物打印机具有两个打印机头，每个打印机头连接到内部储器系统。

[0133] 参考图26，在特定的实施方式中，生物打印机具有带有四个料盒的一个打印机头。每个料盒具有相对于其它料盒的独立z轴运动。每个料盒也与其自身的沉积孔口相关。在某些另外的实施方式中，一次只有一个料盒降低以与适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面交互作用。在其它另外的实施方式中，一个或多个料盒降低以与适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面交互作用。

[0134] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于校准至少一个料盒的位置的装置。在一些实施方式中，用于校准至少一个料盒的位置的装置选自激光对准、光学对准、机械对准、压电对准、磁性对准、电场或电容对准、超声对准、基于图像的对准或其组合。在一些实施方式中，用于校准至少一个料盒的位置的装置是激光对准。在一些实施方式中，用于校准至少一个料盒的位置的装置是基于图像的对准。在一些实施方式中，用于校准至少一个料盒的位置的装置是激光对准和基于图像的对准的组合。

[0135] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于确定下列项的位置的校准装置：1)与选定料盒相关的沉积孔口；以及2)由接收表面支承的打印目标表面。在另外的实施方式中，校准装置计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在又一些其它实施方式中，校准装置在材料的沉积期间监控打印高度。在一些实施方式中，校准装置利用从三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机选择的一个或多个传感器。在一些实施方式中，校准装置是自动化生物打印机的三维校准系统。在各种实施方式中，三维校准系统包括固定到生物打印机的接收表面用于确定生物打印机的沉积孔口的位置的传感器；以及固定到生物打印机的打印机头用于确定与接收表面相关的打印目标表面的位置的传感器；由此，系统计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在一些实施方式中，传感器选自三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机。

[0136] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于分配至少一个料盒的内容物的装置。在一些实施方式中，用于分配至少一个料盒的内容物的装置是活塞的应用、压力的应用、压缩气体的应用、液压系统的应用或其组合的应用。在一些实施方式中，用于分配至少一个料盒的内容物的装置是活塞的应用。在一些实施方式中，活塞的直径小于料盒的直径。

[0137] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于分配选定料盒的内容物的驱

动装置。在一些实施方式中，用于分配选定料盒的内容物的驱动装置利用正位移、气动位移、液压位移、声共振或其组合。在一些实施方式中，打印机头具有用于分配选定料盒的内容物的其自身的独立驱动装置。

[0138] 参考图23a、24a和24b，在特定的实施方式中，用于分配料盒的内容物的驱动装置是包括双线性导轨、步进电机以及整体的丝杠和电机轴的驱动机构。在这个特定的实施方式中，驱动机构附接到z轴定位机构以调节附接的料盒相对于目标打印表面的位置。

[0139] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机还包括接收表面。在另外的实施方式中，接收表面是非细胞毒素表面，生物打印机将生物油墨和/或支持材料分配到非细胞毒素表面上。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机还包括打印机台。在另外的实施方式中，接收表面是打印机台的表面。在其它实施方式中，接收表面是与打印机台分离但固定到台或由台支承的部件。在一些实施方式中，接收表面是平坦的和实质上平坦的。在一些实施方式中，表面是平滑的或实质上平滑的。在其它实施方式中，表面是实质上平坦的和实质上平滑的。在又一些其它实施方式中，接收表面特别设计成适应生物打印的结构的形状、尺寸、纹理或几何形状。在又一些其它实施方式中，接收表面控制或影响生物打印的结构的尺寸、形状、纹理或几何形状。在一些实施方式中，接收表面相对于一个或多个打印机头移动以用料盒或多个料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状。在一些实施方式中，接收表面是标准化验板。在一些实施方式中，接收表面是配合到24井transwell支架内的transwell插入物。

[0140] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于相对于接收表面定位打印机头的致动装置。在其它实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于相对于接收表面定位一个或多个打印机头以用选定料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置。在一些实施方式中，致动装置包括球或丝杠。在一些实施方式中，致动装置包括光学编码器。在一些实施方式中，致动装置包括制动机构以防止打印机头与接收表面的不利接触。在其它实施方式中，致动装置不包括制动机构以防止打印机头与接收表面的不利接触。在一些实施方式中，打印机头具有用于z轴定位的其自身的独立致动装置以调节料盒相对于目标打印表面的位置。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机还包括第二x轴和/或y轴定位机构。

[0141] 参考图23a、23b和25，在特定的实施方式中，打印机头具有用于z轴定位的其自身的独立致动装置以调节料盒相对于目标打印表面的位置。

[0142] 参考图22，在特定的实施方式中，打印机头包括四个独立的料盒，每个料盒具有用于相对于其它料盒的独立z轴运动的其自身的z轴定位机构。

[0143] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括印模，印模用于控制：多个结构的并行的同时沉积并布置在图案中，每个结构具有特定的三维几何形状；具有特定的三维几何形状的单个结构的沉积；或其组合。在另外的实施方式中，印模被永久地固定。在其它实施方式中，印模被可逆地固定。在一些实施方式中，印模控制任何适当数量的结构的并行的同时沉积。在各种实施方式中，印模适当地控制大约2、6、12、24、48、64、96、384、1536、3456或9600个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中，印模控制大约2到大约384个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中，印模配置成补偿标准化验板。在一些实施方式中，在多个结构中的每个结构具有相同的三维几何形状。在其它实施方式中，多个结构没有相同

的三维几何结构。几何形状的非限制性例子是圆柱体、中空圆柱体、多边形、薄板和圆。在一些实施方式中，印模控制多种材料的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模包括每种材料的输入口。在一些实施方式中，印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨或支持材料的室。在一些实施方式中，在多个结构中的每个结构彼此接触以形成单个结构。

[0144] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于冲压或切割以使一个或多个三维生物打印的组织成形为期望几何形状的一个或多个模具的印模。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括用于将一个或多个三维生物打印的组织挤压成期望几何形状的同轴或三轴喷嘴。几何形状的非限制性例子是圆柱体、中空圆柱体、多边形、薄板和球体。在一些实施方式中，圆柱体的外径是50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500μm或更大，包括其中的增量。在一些实施方式中，圆柱体的外径是250μm或500μm。在另外的实施方式中，同轴喷嘴具有双流能力，有至少两种不同材料的至少两个独立输入端和用于同轴管的制备的至少两个独立输出端，同轴管具有核心层和套层，核心层和套层相对于彼此具有材料的不同成分。在又一些其它实施方式中，一个或多个同轴喷嘴中的每个还包括独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每个的流量的装置。在一些实施方式中，独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两种不同的材料中的每种材料的流量的装置允许连续挤压或喷溅挤压。

[0145] 参考图8-1和8-2，在特定的实施方式中，两部分印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨的室。这个室包括可移除盖和可调节底板。为了得到在室内的一层均匀的生物油墨，该室被充满细胞悬液并受离心作用。在盖和上层清液被移除之后，室反转并永久或临时地附接到挤压机构。这个挤压机构朝着印模推可调节底板，将生物油墨驱动到两部分印模内。两部分印模包括具有C形模具的第一印模和压缩C形生物油墨的第二印模以当生物油墨离开第二印模时形成连续中空圆柱形结构。

[0146] 参考图9-3，具有同时产生六个中空管的模具的印模被安装到料盒内。在其它实施方式中，印模具有以相同或不同的形状挤压一个或多个管的模具。在一些实施方式中，料盒在印模的安装之前被预先处理以增加细胞浓度。例如图9-1中所示的离心装置与具有在一端处的可移除插头和在另一端处的自密封口的料盒一起使用。自密封口提供生物油墨悬液的进入和上层清液的稍后移除。料盒包含具有密封物的活塞以防止泄漏。一旦印模被安装到包含生物油墨的料盒上，料盒就可附接到本文公开的生物油墨打印机或挤压设备(见图9-2)。

[0147] 参考图10、11和12，在特定的实施方式中，印模被配置为对24井板兼容的挤压板或模具盖。印模具有24个单独的几何模具以及材料#1和#2的输入口。通常，这样的几何模具可产生单个几何形状或几何形状的混合。在这个特定的实施方式中，所有24个单独的几何模具将对接收表面的所有24个井产生相同的几何形状。一旦材料通过输入口被注入，材料就流经几何模具的形式的预定路径，其控制进入标准24井化验板的每个单独井内的材料的沉积或挤压位置和几何形状，该标准24井化验板用作接收表面。以这种方式，材料被沉积或挤压到单个井、同时多个井或同时所有井内。在这个特定的实施方式中，在单独井中的所产生的组织可选地由一种或两种材料组成。

[0148] 在一些实施方式中，本文公开的生物打印机还包括用于调节温度的装置。在一些实施方式中，用于调节温度的装置调节和/或维持周围环境温度。在其它各种实施方式中，

作为非限制性的例子，用于调节温度的装置调节和/或维持打印头、料盒、料盒的内容物(例如生物油墨、支持材料等)、打印机台和接收表面的温度。

[0149]　在一些实施方式中，用于调节温度的装置是加热元件。在一些实施方式中，用于调节温度的装置是加热器。在一些实施方式中，用于调节温度的装置是辐射加热器、对流加热器、传导加热器、风扇加热器、热交换器或其组合。在一些实施方式中，用于调节温度的装置是冷却元件。在一些实施方式中，用于调节温度的装置是冷却剂的容器、冷冻液体、冰或其组合。在一些实施方式中，用于调节温度的装置是辐射冷却器、对流冷却器、传导冷却器、风扇冷却器或其组合。

[0150]　在各种实施方式中，用于调节温度的装置将温度调节到大约0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或90℃，包括其中的增量。在一些实施方式中，温度被调节到在大约40℃和大约90℃之间。在一些实施方式中，温度被调节到在大约37℃和大约90℃之间。在其它实施方式中，温度被调节到在大约0℃和大约10℃之间。

[0151]　在一些实施方式中，用于调节温度的装置调节沉积顶端和/或料盒的部分或全部的温度。在一些实施方式中，用于调节温度的装置位于打印机头上。在另外的实施方式中，用于调节温度的装置是位于料盒的至少部分的周围的热交换器护层以允许温度调节的液体的流动，其中外部设备调节温度和到打印机头的温度调节的液体的流动。在一些实施方式中，温度调节的液体的温度范围是4℃到40℃。在一些实施方式中，冷却或加热设备不位于打印机头上，且打印机头必须移动到在生物打印机内的冷却或加热设备的位置。

[0152]　参考图27，在特定的实施方式中，打印机头包括在注射器周围的热交换器护层，其中外部设备调节温度和到打印机头的冷却剂的流动。外护层由PET制成。冷却剂在27psi的最大值下流到护层内。冷却剂在大约1atm下流出护层。

[0153]　在一些实施方式中，本文公开的生物打印机还包括用于将湿润剂涂敷到打印机台、接收表面、沉积孔口、生物油墨、支持材料或所打印的结构中的一个或多个的装置。在一些实施方式中，用于涂敷湿润剂的装置是涂敷流体的任何适当的方法(例如喷雾器、吸液管、喷墨等)。在一些实施方式中，湿润剂是水、组织培养基、缓冲盐溶液、浆液或其组合。在另外的实施方式中，在生物油墨或支持材料由生物打印机分配之后，湿润剂被涂敷。在一些实施方式中，湿润剂与生物油墨或支持材料由生物打印机分配同时或实质上同时被涂敷。在一些实施方式中，在生物油墨或支持材料由生物打印机分配之前涂敷湿润剂。

[0154]　打印机头

[0155]　在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机包括一个或多个打印机头(也被称为打印头)。在另外的实施方式中，打印机头包括用于接收并保持至少一个料盒的装置。在又一些其它实施方式中，打印机头将至少一个料盒附接到生物打印机。

[0156]　用于接收并保持至少一个料盒的很多装置是适当的。接收并保持至少一个料盒的适当装置包括可靠地、精确地和安全地将至少一个料盒附接到生物打印机的那些装置。在各种实施方式中，作为非限制性的例子，接收并保持至少一个料盒的装置是磁吸引、套爪卡盘夹、金属箍、螺母、桶适配器或其组合。

[0157]　在一些实施方式中，本文公开的打印机头接收并保持一个料盒。在各种其它实施方式中，本文公开的打印机头同时接收并保持2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个料盒。在另外

的实施方式中，本文公开的打印机头还包括从多个被接收和保持的料盒中选择将要在生物打印中使用的料盒的装置。

[0158] 在一些实施方式中，本文公开的打印机头还包括储器(或与储器流体连通)以包含高于一个或多个料盒的容量的生物油墨和/或支持材料。在另外的实施方式中，储器将生物油墨和/或支持材料供应到一个或多个料盒用于经由分配孔口进行分配。包括储器的打印机头配置在连续或实质上连续的生物打印应用中是特别有用的。很多容积适合于本文公开的储器。在各种实施方式中，储器具有例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500ml或更大的内部容积，包括其中的增量。

[0159] 在一些实施方式中，生物打印涉及使用计算机独立地或相对于彼此配置参数，例如细胞类型、打印高度、泵速、机器人速度、沉积顺序、沉积位置或其组合。在另外的实施方式中，计算机代码规定打印机头的定位以配置在接收表面之上的打印机头高度。在另外的实施方式中，计算机代码规定打印机头的运动的方向和速度以配置生物油墨和/或支持材料的分配特征。

[0160] 在一些实施方式中，本文公开的打印机头连接到独立z轴定位机构。在一些实施方式中，本文公开的打印机头连接到独立装置以调节和/或维持打印机头、所附接的料盒和/或沉积孔口的温度。在一些实施方式中，本文公开的打印机头连接到独立z轴定位机构和独立装置以调节和/或维持打印机头、所附接的料盒和/或沉积孔口的温度。

[0161] 参考图22，在特定的实施方式中，打印机头包括四个独立打印料盒，每个料盒具有其自身的沉积顶端并附接到独立驱动机构以分配料盒的内容物。每个料盒也具有经由其自身的z轴定位机构相对于其它三个料盒的独立z轴运动。虽然在图22中示出每个料盒与注射器针相关，每个料盒独立地具有从注射器针、毛细管或喷墨顶端选择的沉积顶端。在某些实施方式中，一次只有一个料盒降低以与适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面交互作用。在其它另外的实施方式中，一个或多个料盒降低以与适合于接收生物打印的材料的打印机台或接收表面交互作用。可选地，每个料盒具有独立装置以调节和/或维持料盒、沉积孔口和/或内容物的温度。在某些实施方式中，一个或多个料盒能够到达位于生物打印机上的凝胶加热器和冷却器。在另外的实施方式中，只有两个料盒——两个最右边的或两个最左边的——能够到达位于生物打印机上的凝胶加热器和冷却器。

[0162] 参考图26，在特定的实施方式中，生物打印机包括如图22所述的打印机头。这个生物打印机允许一个或两个多井板或Petri盘用作接收表面。这个生物打印机还包括校准装置以确定每个沉积孔口和由接收表面支承的每个打印目标表面的位置。可选地，生物打印机还可包括第二x轴和/或y轴定位机构以增强生物打印机的能力。

[0163] 参考图23a、23b、24a、24b和25，在特定的实施方式中，打印机头具有定制射流台和高精度线性台。打印机头具有通过附接的z轴定位机构的使用相对于在生物打印机内的其它部件的独立z轴运动以在高精度和分辨率的情况下快速调节附接的料盒相对于目标打印表面的位置。定位机构包括丝杠和光学编码器。此外，打印机头附接到驱动机构以分配附接的料盒的内容物。在这个特定的实施方式中，打印机头连接到集成的定位机构和驱动机构。这个特定的定位机构也不包括制动机构以防止打印机头与接收表面的不利接触。混合线性致动器驱动附接到料盒组件(见图24b)的柱塞。为了速度和精度而优化丝杠间距和电机规

范。料盒组件安装到线性导向系统(见图25),其包括附接到线性台的定制传感器托架、光学中断传感器和集成在安装板上的光学标志。

[0164] 料盒支架

[0165] 在某些实施方式中,本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式,本文公开的生物打印机包括一个或多个打印机头。在另外的实施方式中,打印机头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架,每个料盒包括从生物油墨、支持材料及其组合选择的内容物;以及对于每个料盒:用于接收并保持料盒的使料盒与驱动路径对准的装置;分配料盒的内容物的驱动装置,驱动装置独立于其它驱动装置而操作;以及相对于接收表面垂直地定位料盒以用料盒的所分配的内容物来产生特定的三维几何形状的致动装置,致动装置独立于其它致动装置而操作。在其它实施方式中,打印机头包括用于接收并保持多个料盒的料盒支架,料盒支架可旋转以使选定料盒与驱动路径对准。

[0166] 在一些实施方式中,料盒支架附接到生物打印机的可定位打印机头并适合于接收并保持多个料盒。在另外的实施方式中,料盒支架可旋转以使选定料盒与生物打印机的驱动路径对准,使得驱动机构啮合选定料盒以分配所述内容物。

[0167] 在一些实施方式中,每个料盒包括从生物油墨和支持材料中的一个或多个选择的内容物。

[0168] 在一些实施方式中,料盒支架适合于接收并保持多个料盒。在各种实施方式中,料盒支架适合于接收并保持大约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个料盒。在一些实施方式中,料盒支架适合于接收并保持大约2到大约10个料盒。在一些实施方式中,料盒支架适合于接收并保持4个料盒。

[0169] 用于接收并保持至少一个料盒的很多装置是适当的。用于接收并保持至少一个料盒的适当装置包括可靠地、精确地和安全地将至少一个料盒附接到生物打印机的那些装置。在各种实施方式中,装置作为非限制性的例子,用于接收并保持至少一个料盒的是磁吸引、套爪卡盘夹、金属箍、螺母、桶适配器或其组合。

[0170] 在一些实施方式中,料盒支架是圆柱形的。

[0171] 印模

[0172] 在某些实施方式中,本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式,本文公开的生物打印机包括用于控制多个结构的并行的同时沉积的印模,每个结构具有特定的三维几何形状。

[0173] 在一些实施方式中,印模包括:用于接收从生物打印机沉积的生物油墨或支持材料的一个或多个输入口;以及多个输出模具,每个输出模具包括用于使生物油墨或支持材料成形的与每个输入口相关的井;由此,印模允许多个结构的并行的同时沉积,每个结构具有特定的三维几何形状。

[0174] 在一些实施方式中,印模被永久地固定。在其它实施方式中,印模被可逆地固定。在一些实施方式中,在多个结构中的每个结构具有相同的三维几何形状。在一些实施方式中,多个结构具有同质几何形状。在其他的实施方式中,多个结构具有异质几何形状。在一些实施方式中,多个结构被生物打印到标准化验板中。

[0175] 在一些实施方式中,印模控制2-384个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中,印模控制96个结构的并行的同时沉积。在一些实施方式中,印模控制24个结构的并行的

同时沉积。在一些实施方式中，印模控制12个结构的并行的同时沉积。在各种实施方式中，印模控制大约2、4、6、8、12、24、36、48、96或384个结构的并行的同时沉积。

[0176] 在一些实施方式中，印模连接到用于包含一层均匀的生物油墨或支持材料的室，该室位于印模和生物打印机的驱动机构之间。

[0177] 在一些实施方式中，印模控制多种材料的并行的同时沉积。在另外的实施方式中，印模包括每种材料的输入口。

[0178] 多轴喷嘴

[0179] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式，本文公开的生物打印机包括用于将一个或多个三维生物打印的组织挤压成期望几何形状的一个或多个多轴喷嘴。

[0180] 在一些实施方式中，一个或多个多轴喷嘴是一个或多个特别成形的喷嘴，使得穿过喷嘴的生物油墨被成形为特定的几何形状。几何形状的非限制性例子是圆柱体、中空圆柱体、多边形、薄板和球体。在一些实施方式中，生物打印机具有一个或多个同轴喷嘴。在一些实施方式中，生物打印机具有一个或多个三轴喷嘴。在一些实施方式中，生物打印机具有一个或多个同轴或三轴喷嘴。

[0181] 多轴喷嘴具有双重或更大的同心流能力以准备具有多层形态的多轴管，该多层形态由核心层(内层)、套层(外层)以及可选地在核心层和套层之间的一个或多个中间层组成。喷嘴的尺寸基于设计修改而改变。

[0182] 在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是0.5mm到4mm。在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是0.5mm到3mm。在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是0.5mm到2mm。在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是1mm到4mm。在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是2mm到4mm。在喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的外径是3mm到4mm。

[0183] 在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到1.5mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到1.3mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到1.0mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到0.8mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到0.6mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.1mm到0.4mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.6mm到1.5mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.6mm到1.3mm。在同轴喷嘴的一些实施方式中，喷嘴的内径是0.6mm到1.0mm。

[0184] 在一些实施方式中，多轴喷嘴还包括独立地调节通过至少两个独立输出端的至少两个不同材料中的每种材料的流量以准备同轴管的装置，其中任两个相邻的层相对于彼此具有不同成分的材料。在各种实施方式中，穿过喷嘴的挤压的流速是0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0mL/min或更大，包括其中的增量。

[0185] 在同轴喷嘴的一些实施方式中，内层生物油墨的流速等于外层生物油墨的流速。在同轴喷嘴的一些实施方式中，内层生物油墨的流速不同于外层生物油墨的流速。在同轴喷嘴的一些实施方式中，内层生物油墨的流速比外层生物油墨的流速快50％。在同轴喷嘴的一些实施方式中，内层生物油墨的流速是外层生物油墨的流速的两倍那么快。在一些实施方式中，任一层的流速比相邻层慢。

[0186] 在一些实施方式中，多轴喷嘴能够连续挤压和/或溅射挤压。在同轴喷嘴的一些实施方式中，当套层通过连续挤压被制备时，核心层通过溅射挤压被制备。在同轴喷嘴的其它实施方式中，当套层通过溅射挤压被制备时，核心层通过连续挤压被制备。

[0187] 球体和圆柱体(例如图34a)代表使用本文所述的方法的基本几何结构。在生物打印的结构的各种实施方式中，I-生物油墨(在图34a中用暗阴影示出)是唯一组分，与正常生物油墨(即没有免疫调制细胞的生物油墨)一起以梯度存在，或一起缺乏。同轴或三轴挤压喷嘴便于圆柱形(例如图34b：I-生物油墨放置在核心层或套层中)或球形性质(例如图34c：I-生物油墨放置在核心层或套层中)的多层压结构。当在横截面(未示出)中观看时，三轴沉积涉及额外的对称嵌套的圆柱体。这些几何形状代表用于构造大得多和更复杂的结构的可变构件块，目标是在包括或不包括生物材料的情况下再现在活体内和在组织状细胞密度下的一定程度的组织功能。因此，在图34d中示出利用基本构件块的一些代表性装配：(A)图案化具有管状结构的例子，(B)从球体产生的补片，其中图案化可随着在球形生物油墨的分辨率上的精度而改变，(C)在补片和管状结构中的梯度I-生物油墨圆柱体的使用，以及(D)在具有简单图案的补片中的同质I-生物油墨和正常生物油墨圆柱体的使用。

[0188] 料盒

[0189] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，附接到生物打印机的料盒包括生物油墨或支持材料。在一些实施方式中，生物打印机将生物油墨或支持材料分配在特定的图案中和在特定的位置处，以便形成特定的细胞结构、组织或器官。为了制造复杂的组织结构，生物打印机以精确的速度和以均匀的数量沉积生物油墨或支持材料。因此，存在对下列项的需要：(a)具有平滑或实质上平滑的分配孔口的料盒，以及(b)平滑或实质上平滑的内表面的料盒。如在本文使用的，“料盒”意指能够接收(并保持)生物油墨和/或支持材料的任何实物。

[0190] 在一些实施方式中，本文公开的料盒包括生物油墨。在一些实施方式中，本文公开的料盒包括支持材料。在一些实施方式中，本文公开的料盒包括生物油墨和支持材料的组合。在一些实施方式中，本文公开的料盒包括包含哺乳动物细胞的生物油墨。

[0191] 在某些实施方式中，本文公开了与本文公开的生物打印机一起使用的料盒，其包括至少一个分配孔口。在一些实施方式中，料盒包括一个分配孔口。在各种其它实施方式中，料盒包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个分配孔口。在另一实施方式中，分配孔口的边缘是平滑的或实质上平滑的。

[0192] 很多形状适合于本文公开的分配孔口。在各种实施方式中，作为非限制性的例子，分配孔口的适当形状包括圆形、卵圆形、三角形、方形、矩形、多边形和不规则形。在一些实施方式中，孔口是圆形的。在其它实施方式中，孔口是正方形的。在又一些其它实施方式中，孔口是椭圆形的、长圆形的或矩形的，并分配以带状形式的固体或半固体生物油墨和/或支持材料。

[0193] 在一些实施方式中，料盒的内表面是平滑的或实质上平滑的。在一些实施方式中，料盒由刚性结构组成以便于校准。在一些实施方式中，料盒的壁由抵抗细胞的附着的材料组成。在一些实施方式中，带色盒由生物相容的材料组成。

[0194] 在一些实施方式中，料盒是用后即可丢弃的单次使用料盒。用后即可丢弃的单次使用料盒安装到用于接收并保持在生物打印机上的料盒的适当装置，其最终使料盒与驱动

路径对准。料盒优选地在流线型制造过程中被填充，并容易安装到生物打印机的打印头内和从生物打印机的打印头移除。在一些实施方式中，料盒是塑料注射器。

[0195] 参考图16，在特定的实施方式中，用后即可丢弃的单次使用料盒是塑料注射器，其在这里被示为具有作为分配孔口的注射器针。

[0196] 很多类型的料盒适合于与本文公开的生物打印机和使用其的方法一起使用。在一些实施方式中，料盒与涉及通过一个或多个分配孔口挤压半固体或固态生物油墨或支持材料的生物打印相容。在一些实施方式中，料盒与涉及通过一个或多个分配孔口分配液态或半固态细胞溶液、细胞悬液或细胞浓缩物的生物打印相容。在一些实施方式中，料盒与非连续生物打印相容。在一些实施方式中，料盒与连续和/或实质上连续的生物打印相容。在一些实施方式中，料盒连接到内容物的远程储器。远程储器适当地包含宽范围的容积。在各种实施方式中，远程储器适当地包含内容物的大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mL或更多。在各种进一步的实施方式中，远程储器适当地包含内容物的大约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100mL或更多。在又一些其它实施方式中，远程储器适当地包含内容物的大约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000mL或更多。

[0197] 在一些实施方式中，料盒是毛细管或微量吸液管。在一些实施方式中，料盒是注射器或针或其组合。很多内径适合于实质上圆形或圆柱形料盒。在各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的内径包括1、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多μm，包括其中的增量。在其它各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的内径包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多mm，包括其中的增量。在一些实施方式中，料盒具有大约1μm到大约1000μm的内径。在特定的实施方式中，料盒具有大约500μm的内径。在另一特定的实施方式中，料盒具有大约250μm的内径。很多内部容积适合于本文公开的料盒。在各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的内部容积包括1、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多μl，包括其中的增量。在其它各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的内部容积包括1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500或更多ml，包括其中的增量。在一些实施方式中，料盒具有大约1μl到大约50μl的容积。在特定的实施方式中，料盒具有大约5μl的容积。

[0198] 在一些实施方式中，料盒与例如在美国专利号7,051,654中所述的接收表面上的生物油墨和/或支持材料的喷墨打印相容。在另外的实施方式中，料盒包括在本文所述的计算机代码的控制下以电压选通喷嘴或针的形式的分配孔口。

[0199] 在一些实施方式中，喷墨打印需要紧密地耦合到专业高速喷墨电磁阀的注射器泵。在一些实施方式中，分配容积由注射器压力、阀致动时间和精确分配顶端控制。在一些实施方式中，通过两级电子阀来控制精确分配控制，其中高压脉冲后面是较低电压保持电流。在另外的实施方式中，高电压脉冲是12到40VDC，而较低电压保持电流是12到24VDC。在一些实施方式中，阀定时由TTL控制电压控制。在一些实施方式中，脉冲是0.35到2.0微秒。在一些实施方式中，注射器压力是0到120psig。

[0200] 在一些实施方式中，注射器被灌注。在一些实施方式中，灌注料盒增加了分配、沉积或挤压过程的准确度。如在本文使用的，“已灌注的(primed)”意味着料盒的内容物通过压紧和推进料盒的内容物而变得准备好分配、沉积或挤压，直到待分配的材料(生物油墨或支持材料)位于与分配孔口接触的位置上为止。见例如图3。在一些实施方式中，当内容物紧

密的或实质上紧密的且内容物与料盒的孔口物理接触时，料盒是已灌注的。

[0201] 在一些实施方式中，料盒被标记以指示其内容物的成分。在另外的实施方式中，料盒被标记以指示包含在其中的生物油墨和/或支持材料的成分。在一些实施方式中，料盒的表面被着色。在一些实施方式中，料盒的外表面被染色、油漆、用笔标记、由尖刀标记或其组合。

[0202] 在一些实施方式中，料盒的外表面被标记以增加料盒的表面的不透明度（例如以增加从料盒的表面反射的激光束的数量）。在一些实施方式中，料盒的表面被着色。在一些实施方式中，料盒的外表面被刻划。如在本文使用的，“刻划（scored）”意指标记料盒的表面以减少表面的平滑度。任何适当的方法用于刻划料盒的表面（例如酸性物质的应用、腐蚀性物质的应用、磨损物质的应用等）。在一些实施方式中，料盒的外表面被油漆、抛光（例如火抛光）、蚀刻（例如激光蚀刻）、用笔标记、由尖刀标记或其组合。

[0203] 夹具

[0204] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，附接到生物打印机的料盒包括生物油墨或支持材料。在一些实施方式中，生物打印机将生物油墨或支持材料分配在特定的图案中和在特定的位置处，以便形成特定的细胞结构、组织或器官。在一些实施方式中，包括生物油墨的料盒是用后即可丢弃的。在一些实施方式中，料盒从生物打印机弹出，后面是内容物的挤压。在一些实施方式中，新料盒随后附接到生物打印机。

[0205] 为了制造复杂的结构，本文公开的生物打印机以适当的可重复准确度从料盒分配生物油墨和/或支持材料。在各种实施方式中，适当的可重复准确度包括在任何轴上的大约±5、10、20、30、40或50μm。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机以大约±20μm的可重复准确度从料盒分配生物油墨和/或支持材料。然而，料盒的不受控制的移除和插入可导致打印机头（及因此导致料盒）相对于组织结构的位置的变更，使得从新料盒沉积的第一个生物油墨微粒的放置的精度可选地相对于从前一料盒沉积的最后一个生物油墨微粒而改变。因此，存在对将料盒附接和固定到打印机头的方法的需要，其中所述附接和固定产生在打印机头的位置上的最小变更。

[0206] 在某些实施方式中，本文公开了将料盒附接到生物打印机的方法，其包括：(a)将料盒插入套爪卡盘内，其中套爪卡盘附接到生物打印机的打印机头；以及(b)调节套爪卡盘的外套圈；其中插入和调节实质上不改变打印机头的位置。

[0207] 在某些实施方式中，本文公开了用于将料盒附接到生物打印机的系统，其包括：用于接收料盒并将料盒固定到生物打印机的打印机头的装置；其中用于接收和固定料盒的装置的使用实质上不改变打印机头的位置。在一些实施方式中，用于接收料盒并将料盒固定到打印机头的装置是卡盘或金属箍。如在本文使用的，“卡盘（chuuck）”意指由可调节卡爪组成的保持设备。在一些实施方式中，用于接收料盒并将料盒固定到打印机头的装置是弹性夹头。如在本文使用的，“弹性夹头（collet）”意指形成在待保持的实物周围的套环并施加强夹紧的卡盘的子类型。如在本文使用的，“金属箍（feerule）”意指用于将一个实物固定到另一实物的带（例如金属带）。在一些实施方式中，用于接收料盒并将料盒固定到打印机头的装置是桶适配器。如在本文使用的，“桶适配器（barrel adaptor）”意指用于将一个实物固定到另一实物的螺纹管。

[0208] UV模块

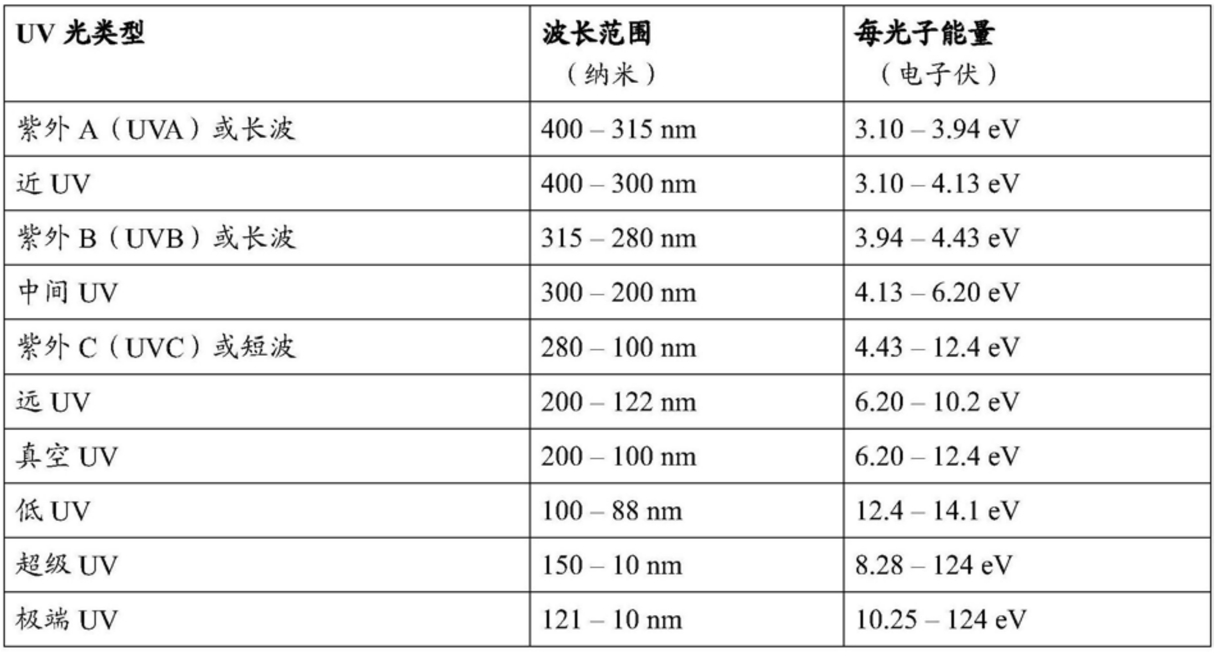
[0209] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，生物打印机包括紫外(UV)光模块。在另外的实施方式中，UV模块使本文公开的生物打印机能够自动固化并打印UV交联材料。在一些实施方式中，UV模块包括用于将料盒的内容物(例如玻璃毛细管)暴露于UV光的光室。在一些实施方式中，UV模块包括用于均匀地沿着其长度将料盒的内容物暴露于UV光的UV光线路。在一些实施方式中，UV模块包括狭槽以接受光衰减滤波器，其减小料盒的内容物被暴露的UV光的强度。在一些实施方式中，UV模块与生物打印机集成在一起。在各种另外的实施方式中，UV模块永久地、半永久地或可逆地附接到生物打印机。在其它实施方式中，UV模块不附接到生物打印机。

[0210] 在一些实施方式中，通过首先将未固化的材料抽吸到玻璃毛细管内来使用本文所述的UV模块。在另外的实施方式中，玻璃毛细管然后被降低到光室内，其中高功率光纤光线路越过毛细管的长度传输来自UV光源的UV光。在又一些其它实施方式中，一旦被固化(例如交联)，玻璃毛细管就从光室被提升出，且材料准备打印(例如被挤压或沉积等)。对于料盒的内容物包括包含细胞的生物油墨和/或支持材料的应用，可选的衰减滤波器放置在毛细管和光导之间以实现较低的UV强度。

[0211] 很多UV光源适合于与本文所述的UV模块一起使用。UV光是具有在范围10nm到400nm中的波长的电磁辐射和从3eV到124eV的能量的电磁辐射。UV光在一些情况下改变分子中的化学键并可引起化学反应。来自各种源的UV光通过具有很多适当的波长和很多适当的相关能量来被特征化。见以下的表1。

[0212] 表1

[0213]



UV 光类型	波长范围 （纳米）	每光子能量 （电子伏）
紫外 A（UVA）或长波	400 – 315 nm	3.10 – 3.94 eV
近 UV	400 – 300 nm	3.10 – 4.13 eV
紫外 B（UVB）或长波	315 – 280 nm	3.94 – 4.43 eV
中间 UV	300 – 200 nm	4.13 – 6.20 eV
紫外 C（UVC）或短波	280 – 100 nm	4.43 – 12.4 eV
远 UV	200 – 122 nm	6.20 – 10.2 eV
真空 UV	200 – 100 nm	6.20 – 12.4 eV
低 UV	100 – 88 nm	12.4 – 14.1 eV
超级 UV	150 – 10 nm	8.28 – 124 eV
极端 UV	121 – 10 nm	10.25 – 124 eV

[0214] 在一些实施方式中，作为非限制性的例子，UV光的适当源包括UV灯、UV荧光灯、UV LED、UV激光器等。UV灯(例如黑光、黑光蓝或BLB灯等)发射长波UV辐射和非常少可见的光。一般使用发射UV的磷产生荧光黑光。一般用于近368-371nm发射峰值的磷是掺铕锶氟硼酸盐($SrB_4O_7F:Eu^{2+}$)或掺铕锶硼酸盐($SrB_4O_7:Eu^{2+}$)，而用于产生大约350-353nm的峰值的磷是

掺铅钡硅酸盐（$BaSi_2O_5:Pb^+$）。一般还使用伍德玻璃、阻挡几乎高于400nm的所有可见光的掺镍-氧化物玻璃产生荧光黑光。也可通过简单地使用伍德玻璃而不是透明玻璃作为公共白炽灯的外壳来非常低效地形成黑光。由于在灯泡内的汞的峰值发射，没有发磷光的涂层以将UV转换成可见光的UV荧光灯发射具有在253.7nm和185nm处的两个峰值的紫外光。在添加适当的磷（发磷光的涂层）的情况下，它们可被修改以产生UVA或UVB。可制造发光二极管（LED）以发射在UV范围内的光，虽然实际LED阵列被限制在365nm之下。可制造UV激光二极管和UV固态激光器以发射在UV范围内的光。直接UV发射激光二极管在375nm处是可用的。使用掺铈锂锶铝氟化物（Ce:LiSAF）来演示UV二极管激光器。从使用频率双倍或三倍二极管泵浦固态（DPSS）技术的固态模块中的二极管产生短于375nm的波长。可用的波长包括262、266、349、351、355和375nm。

[0215]　参考图19，在特定的实施方式中，UV模块包括UV光源，其为UV灯。此外在这个实施方式中，料盒包括玻璃毛细管，UV交联材料被抽吸到该玻璃毛细管内。料盒位于UV模块的光室内，使得它离UV灯大约3英寸。UV灯在这个实施方式中发射具有大约365nm的波长的UV光。

[0216]　参考图20，在特定的实施方式中，生物打印机包括保持料盒810的打印机头800。在这个实施方式中，料盒810包括玻璃毛细管，其部分地降低到附接到生物打印机的UV光模块820内。UV模块820在这种情况下包括壳体、盖和开口以允许料盒810的引入。

[0217]　参考图21，在另一特定的实施方式中，保持料盒810的打印机头800完全降低到UV光模块820内。

[0218]　在一些实施方式中，UV模块使本文公开的生物打印机能够通过将UV交联材料暴露于UV光一段预定的时间段来自动固化并打印UV交联材料。对UV光源的暴露的很多持续时间是适当的。按照本文提供的公开，本领域中的技术人员将认识到，特定的UV交联材料适合于特定的暴露时间。在一些实施方式中，暴露时间被选择以完全UV交联材料，导致更固体的结构。在其它实施方式中，暴露时间被选择以部分地UV交联材料，导致更半固体的结构。在各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的暴露时间包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多秒。在其它各种实施方式中，作为非限制性的例子，适当的暴露时间包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多分钟。

[0219]　在一些实施方式中，暴露时间是大约5秒到大约15分钟。在另外的实施方式中，暴露时间是大约10秒到大约10分钟。在又一些其它实施方式中，暴露时间是大约15秒到大约5分钟。在一些情况下，针对在UV交联材料中的细胞的存在而调节暴露时间。

[0220]　接收表面

[0221]　在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，生物打印机将生物油墨和/或支持材料的多个成分、区段和/或区域分配到接收表面上。在另外的实施方式中，分配在特定的图案中和在特定的位置处出现。在又一些其它实施方式中，生物打印机将生物油墨和/或支持材料沉积到接收表面上的位置由用户输入进行限定并被翻译成计算机代码。

[0222] 在一些实施方式中，生物油墨和/或支持材料的成分、区段和/或区域中的每个具有小于300mm x 300mm x 160mm的尺寸。仅作为例子，生物油墨或支持材料的区段的尺寸可选地是75mm x 5.0mm x 5.0mm、0.3mm x 2.5mm x 2.5mm、1mm x 1mm x 50mm或150mm x 150mm x 80mm。由于每个区段的通常小的尺寸且在一些情况下需要高精确度，在接收表面中的微小瑕疵可导致细胞结构、组织或器官的瑕疵(和可能故障)。因此，存在对能够接收生物油墨和/或支持材料的区段的实质上平滑和实质上平坦的接收表面或限定的或实质上限定的接收表面的需要。

[0223] 在某些实施方式中，本文公开了用于接收由本文公开的生物打印机产生的一个或多个结构的接收表面。在一些实施方式中，接收表面是平坦的或实质上平坦的。在一些实施方式中，接收表面是平滑的或实质上平滑的。在一些实施方式中，接收表面是平坦的或实质上平坦的。在一些实施方式中，接收表面是限定的或实质上限定的。在其它实施方式中，接收表面特别设计成适应特定的生物打印结构的形状、尺寸、纹理或几何形状。在另外的实施方式中，接收表面控制或影响生物打印结构的尺寸、形状、纹理或几何形状。

[0224] 在一些实施方式中，接收表面包括固体材料、半固体材料或其组合。在一些实施方式中，接收表面包括玻璃、有涂层的玻璃、塑料、有涂层的塑料、金属、金属合金或其组合。在一些实施方式中，接收表面包括凝胶。在一些实施方式中，接收表面和其上的任何涂层是生物相容的。在各种实施方式中，接收表面包括本文公开的任何支持材料和/或吸持材料。在特定的实施方式中，接收表面包括聚合NovoGel™或聚合琼脂糖、聚合明胶、细胞外基质(或其成分)、胶原质或其组合。在一些实施方式中，接收表面是标准化验板。在一些实施方式中，接收表面是配合到24井transwell支架内的transwell插入物。

[0225] 软件

[0226] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，附接到生物打印机的一个或多个料盒包括生物油墨或支持材料。在一些实施方式中，生物打印机将生物油墨或支持材料分配在特定的图案中和在特定的位置处，以便形成特定的细胞结构、组织或器官。

[0227] 为了制造复杂的组织结构，生物打印机将在精确位置处的生物油墨或支持材料(在二维或三维中)沉积在接收表面上。在一些实施方式中，生物打印机沉积生物油墨和/或支持材料的位置由用户输入限定并被翻译成计算机代码。在另外的实施方式中，计算机代码包括在数字处理设备的中央处理单元(CPU)中可执行的、被写入以执行限定的任务的一系列指令。在一些实施方式中，作为非限制性的例子，包括打印高度、泵速、机器人速度、可变分配孔口的控制、UV强度和UV暴露时间的额外生物打印参数由用户输入限定并被翻译成计算机代码。在其它实施方式中，这样的生物打印参数不直接由用户输入限定，而是通过本文所述的计算机代码从其它参数和条件得到。

[0228] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织结构、组织和器官的方法，其包括：接收期望组织结构的视觉表示的输入的计算机模块；产生一系列命令的计算机模块，其中命令基于视觉表示并由生物打印机可读取；向生物打印机提供该系列命令的计算机模块；以及根据命令来沉积生物油墨和/或支持材料以形成具有限定的几何形状的结构的生物打印机。

[0229] 非临时计算机可读存储介质

[0230] 在一些实施方式中，生物打印机沉积生物油墨和/或支持材料的位置是由用户输入进行限定的并被翻译成计算机代码。在一些实施方式中，本文公开的设备、系统和方法还包括非临时计算机可读存储介质或使用计算机可读程序代码编码的存储介质。在另外的实施方式中，计算机可读存储介质是数字处理设备的有形部件，例如生物打印机(或其部件)或连接到生物打印机(或其部件)的计算机。在又一些其它实施方式中，计算机可读存储介质可选地可从数字处理设备移除。在一些实施方式中，作为非限制性的例子，计算机可读存储介质包括CD-ROM、DVD、闪存设备、固态存储器、磁盘驱动器、磁带驱动器、光盘驱动器、云计算系统和服务等。在一些情况下，程序和指令在存储介质上被永久地、实质上永久地、半永久地或非临时地编码。

[0231] 计算机模块

[0232] 在一些实施方式中，本文所述的设备、系统和方法包括软件、服务器和数据库模块。在一些实施方式中，“计算机模块”是与较大的计算机系统交互作用的软件部件(包括代码段)。在另外的实施方式中，软件模块(或程序模块)以一个或多个文件的形式出现，并一般处理在较大的软件系统内的特定任务。

[0233] 在一些实施方式中，模块被包括在一个或多个软件系统中。在其它实施方式中，模块与一个或多个其它模块一起集成到一个或多个软件系统内。计算机模块可选地是代码或可选地不是单独可识别的代码的独立段。在一些实施方式中，模块在单个应用中。在其它实施方式中，模块在多个应用中。在一些实施方式中，模块被托管在一个机器上。在其它实施方式中，模块被托管在多个机器上。在一些实施方式中，模块被托管在一个位置上的多个机器上。在其它实施方式中，模块被托管在多于一个位置上的多个机器上。本文进一步描述了位置和定位数据的格式化。在一些实施方式中，作为非限制性的例子，本文所述的数据文件以任何适当的数据串行化格式包括tab键分隔的值、逗号分隔的值、符号分隔的值、定界符分隔带值、XML、JSON、BSON和YAML——被格式化。计算机模块的关键特征是，它允许最终用户使用计算机来执行所识别的功能。

[0234] 图形用户界面

[0235] 在一些实施方式中，计算机模块包括图形用户界面(GUI)。如在本文使用的，“图形用户界面”意指使用存储了信息的应用和层次或其它数据结构的输入和输出的图形以及文本表示的用户环境。在一些实施方式中，计算机模块包括显示屏。在另外的实施方式中，计算机模块经由显示屏显现二维GUI。在其它实施方式中，计算机模块经由显示屏显现三维GUI，例如虚拟现实环境。在一些实施方式中，显示屏是触摸屏或多触摸屏并显现交互式GUI。

[0236] 在一些实施方式中，显示屏显现本质上由包括实质上相同形状和实质上相等尺寸的规则地间隔开的实物的网格组成的GUI。所显现的实物具有任何适当的形状。在一些实施方式中，作为非限制性的例子，实物的适当形状包括圆形、卵形、正方形、矩形、三角形、菱形、多边形或其组合。

[0237] 在一些实施方式中，用户限定一个或多个实物的内容以形成期望组织结构的二维或三维视觉表示。见例如图5。在一些实施方式中，作为非限制性的例子，实物的用户限定的内容是具有各种成分的生物油墨或具有各种成分的支持材料。在一些实施方式中，用户通过修改细胞的颜色或实物的形状来限定实物的内容。

[0238] 生物油墨

[0239] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的设备、系统和方法。在一些实施方式中，设备包括用于接收并保持可选地包含生物油墨的至少一个料盒的一个或多个打印机头。在一些实施方式中，方法包括生物油墨的使用。在另外的实施方式中，通过使用本文所述的设备、系统和方法制造的组织和器官包括在制造的时间或其后的生物油墨。

[0240] 生物油墨具有高细胞密度或天然型细胞密度。在各种实施方式中，生物油墨的细胞密度是30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％或更大，包括其中的增量。在一些实施方式中，生物油墨本质上由细胞组成。

[0241] 在一些实施方式中，“生物油墨”包括液体、半固体或固体成分，其包括多个细胞。在一些实施方式中，生物油墨包括液态或半固态细胞溶液、细胞悬液或细胞浓缩物。在另外的实施方式中，细胞溶液、悬液或浓缩物包括液态或半固态(例如粘性)载体和多个细胞。在又一些其它实施方式中，载体是适当的细胞营养介质，例如本文所述的那些介质。在一些实施方式中，生物油墨包括半固体或固体多细胞聚集体或多细胞体。在另外的实施方式中，通过1)以预先确定的比混合多个细胞或细胞聚集体和生物相容液体或凝胶以导致生物油墨，以及2)压紧生物油墨以产生具有期望细胞密度和粘性的生物油墨来产生生物油墨。在一些实施方式中，生物油墨的压紧是通过离心沉淀、正切流动过滤(“TFF”)或其组合来实现。在一些实施方式中，生物油墨的压紧导致可挤压的成分，允许多细胞聚集体或多细胞体的形成。在一些实施方式中，“可挤压的”意指能够通过经由喷嘴或孔口(例如一个或多个孔或管)迫使(例如在压力下)来成形。在一些实施方式中，生物油墨的压紧从使细胞生长到适当的密度产生。生物油墨所必需的细胞密度将随着所使用的细胞和所产生的组织或器官而改变。在一些实施方式中，生物油墨的细胞被粘着和/或粘附。在一些实施方式中，“cohere(粘着)”、“cohered”和“cohesion”指粘结细胞、多细胞聚集体、多细胞体和/或其层的细胞-细胞粘附特性。在另外的实施方式中，术语与“fuse(熔合)”、“fused”和“fusion”可互换地使用。在一些实施方式中，生物油墨此外包括支持材料、细胞培养基、细胞外基质(或其组合)、细胞胶粘剂、细胞死亡抑制剂、抗凋亡剂、抗氧化剂、压出用胶料和其组合。

[0242] 细胞

[0243] 在各种实施方式中，本文公开了包括包含多个细胞的液体、半固体或固体成分的生物油墨。在一些实施方式中，生物油墨包括液态或半固态细胞溶液、细胞悬液或细胞浓缩物。在一些实施方式中，任何哺乳动物细胞适合于用在生物油墨中和使用本文所述的设备、系统和方法制造组织和器官中。在各种实施方式中，细胞是任何适当的细胞。在另外的各种实施方式中，细胞是脊椎动物细胞、哺乳动物细胞、人类细胞或其组合。在一些实施方式中，在本文公开的方法中使用的细胞的类型取决于所产生的细胞结构、组织或器官的类型。在一些实施方式中，生物油墨包括一种类型的细胞(也被称为“均质油墨”)。在一些实施方式中，生物油墨包括多于一种类型的细胞(也被称为“异质油墨”)。

[0244] 在另外的实施方式中，作为非限制性的例子，细胞是收缩或肌细胞(例如骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和成肌细胞)、结缔组织细胞(例如骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞和分化成造骨细胞、软骨细胞或淋巴组织的细胞)、骨髓细胞、内皮细胞、皮肤细胞、上皮细胞、胸细胞、血管细胞、血细胞、淋巴细胞、神经细胞、神经梢细胞、胃肠细胞、肝细胞、胰腺细胞、肺细胞、气管细胞、角膜细胞、泌尿生殖细胞、肾细胞、生殖细胞、脂肪细胞、实质细胞、周

细胞、间皮细胞、间质细胞、未分化细胞(例如胚细胞、干细胞和祖细胞)、内胚层衍生的细胞、中胚层衍生的细胞、外胚层衍生的细胞及其组合。

[0245] 在一些实施方式中,细胞是成体分化细胞。在另外的实施方式中,“分化细胞”是具有在隔离的时间与例如平滑肌细胞、成纤维细胞或内皮细胞一致的组织特定显型的细胞,其中组织特定显型(或显示显型的可能性)从隔离的时间到使用的时间被维持。在其它实施方式中,细胞是成体非分化细胞。在另外的实施方式中,“非分化细胞”是没有或失去例如平滑肌细胞、成纤维细胞或内皮细胞的决定性组织特定特性的细胞。在一些实施方式中,非分化系统包括干细胞。在另外的实施方式中,“干细胞”是展示潜能和自我更新的细胞。干细胞包括但不限于全能细胞、多能细胞、多能性系统、寡能细胞、单能细胞和祖细胞。干细胞可选地是胚胎干细胞、成体干细胞、羊膜干细胞和感应多能干细胞。在又一些其它实施方式中,细胞是成体分化细胞和成体非分化细胞的混合。

[0246] 在一些实施方式中,细胞是免疫调制细胞。在另外的实施方式中,免疫调制细胞选自间充质干细胞(MSC)或巨噬细胞或这两者的组合。在一些实施方式中,间充质干细胞是骨和/或脂肪衍生的。在一些实施方式中,巨噬细胞是从组织和/或血液得到。在一些实施方式中,巨噬细胞是M2激活的巨噬细胞。在一些实施方式中,与脾脏、血液和/或其它组织位置隔离的M2激活的巨噬细胞被添加到生物油墨混合物。在一些实施方式中,神经巨噬细胞在被添加到生物油墨混合物之前在活体外被激活。在一些实施方式中,神经巨噬细胞被添加到合并必要的细胞因子用于巨噬细胞的M2激活的生物油墨混合物。在一些实施方式中,神经巨噬细胞被添加到包含产生必要的细胞因子用于巨噬细胞的M2激活的细胞的生物油墨混合物。在一些实施方式中,巨噬细胞和MSC的混合物被组合在细胞的生物油墨混合物中。在一些实施方式中,实质支持细胞,例如但不限于成纤维细胞,被添加到生物油墨混合物以增强生物油墨的结构特性。如在本文使用的,除了非免疫调制细胞和/或生物材料支持的可能的但不是强制的存在以外,“I-生物油墨”意指还包含如本文所述的免疫调制细胞的某个比例的生物油墨混合物。在一些实施方式中,I-生物油墨包括(1)实质细胞;以及(2)MSC、巨噬细胞或其组合。在一些实施方式中,I-生物油墨包括(1)实质细胞;(2)MSC、巨噬细胞或其组合;以及(3)生物材料支持,其中生物材料支持是如本文限定的一个或多个压出用胶料。在一些实施方式中,生物材料支持是水凝胶。

[0247] 细胞培养基

[0248] 在一些实施方式中,生物油墨包括细胞培养基。细胞培养基是任何适当的培养基。在各种实施方式中,作为非限制性的例子,适当的细胞培养基包括Dulbecco磷酸盐缓冲盐水、厄尔平衡盐、汉克斯平衡盐、Tyrode’s盐、阿氏液、格氏平衡盐溶液、克雷布斯-亨斯雷特改良缓冲液、克-林二氏重碳酸盐缓冲液、帕克盐水、达尔伯克改良伊格尔培养基、达尔伯克改良伊格尔培养基/F-12营养培养基、F-10营养培养基混合物(Ham’s F-10)、199培养基、最小必需伊格尔培养基、RPMI-1640培养基、BFJB培养基(Fitton-Jackson改良)、Click’s培养基、CMRL-1066培养基、Fischer’s培养基、Glascow最小必需培养基(GMEM)、Iscove’s达尔伯克改良伊格尔培养基(IMDM)、L-15培养基(Leibovitz)、McCoy’s 5A改良培养基、NCTC培养基、Swim’s S-77培养基、Waymouth培养基E或其组合。在一些实施方式中,细胞培养基被改良或补充。在一些实施方式中,细胞培养基还包括白朊、硒、铁传递蛋白、胎球蛋白、糖、氨基酸、维他命、生长因子、细胞因子、荷尔蒙、抗生素、脂质、脂质载体、环糊精或其组合。

[0249] 细胞外基质

[0250] 在一些实施方式中，生物油墨还包括细胞外基质或其衍生物的一个或多个组分。在一些实施方式中，“细胞外基质(extracellular matrix)”包括由细胞产生并从细胞运送到细胞外空间内的蛋白质，其中它们可用作将组织保持在一起、提供抗张强度和/或便于细胞信号传导的支持。细胞外基质组分的例子包括但不限于胶原质、纤连蛋白、LN层粘连蛋白、透明质酸盐、弹力蛋白和蛋白聚糖。例如，多细胞聚集体可选地包含各种ECB蛋白质(例如明胶、纤维蛋白原、纤维蛋白、胶原质、纤连蛋白、LN层粘连蛋白、弹力蛋白和/或蛋白聚糖)。ECM组分或ECM组分的衍生物可被添加到用于形成多细胞聚集体的细胞糊状物。被添加到细胞糊状物的ECM组分或ECM组分的衍生物可从人类或动物源被净化，或通过本领域中已知的重组方法产生。可选地，ECM组分或ECM组分的衍生物可由细长细胞主体中的细胞自然地分泌，或用于产生细长细胞主体的细胞可通常由本领域中已知的任何适当的方法操纵以改变一个或多个ECM组分或ECM组分的衍生物和/或一个或多个细胞粘附分子或细胞基底粘附分子(例如选择蛋白、整联蛋白、免疫球蛋白和钙粘蛋白)的表达水平。ECM组分或ECM组分的衍生物可促进在多细胞聚集体中的细胞的内聚。例如，明胶和/或纤维蛋白原可适当地添加到用于形成多细胞聚集体的细胞糊状物。纤维蛋白原可通过凝血酶的添加而转换成纤维蛋白。

[0251] 在一些实施方式中，生物油墨还包括促进细胞粘附的制剂。

[0252] 在一些实施方式中，生物油墨还包括抑制细胞死亡(例如坏疽、编程性细胞死亡或自吞作用)的制剂。在一些实施方式中，生物油墨还包括抗细胞凋亡剂。抑制细胞死亡的制剂包括但不限于小分子、抗体、缩酸氨、肽体或其组合。在一些实施方式中，抑制细胞死亡的制剂选自抗TNF制剂、抑制白介素的活动的制剂、抑制干扰素的活动的制剂、抑制GCSF(粒细胞集落刺激因子)的活动的制剂、抑制巨噬细胞炎症蛋白的活动的制剂、抑制TGF-B(转化生长因子B)的活动的制剂、抑制MMP(基质金属蛋白酶)的活动的制剂、抑制半胱天冬酶的活动的制剂、抑制MAPK/JNK信号级联放大的活动的制剂、抑制Src激酶的活动的制剂、抑制JAK(Janus激酶)的活动的制剂或其组合。在一些实施方式中，生物油墨包括抗氧化剂。

[0253] 压出用胶料

[0254] 在一些实施方式中，生物油墨还包括挤压复合物(即修改生物油墨的挤压特性的复合物)。挤压复合物的例子包括但不限于凝胶、水凝胶(包括本文所述的UV交联和热致可逆水凝胶)、表面活性剂的多元醇(例如普卢兰尼克F-127或PF-127)、热响应性聚合物、透明质酸盐、褐藻酸盐、细胞外基质组分(和其衍生物)、胶原蛋白、其它生物相容天然或合成聚合物、纳米纤维和自组装纳米纤维。

[0255] 用各种方式定义有时被称为胶状物的凝胶。例如，美国药典将凝胶定义为由悬液组成的半固体系统，悬液由小无机粒子或被液体渗透的大有机分子构成。凝胶包括单相或双相系统。单相凝胶由均匀地分布在整个液体中的有机大分子组成，以这样的方式使得没有明显的边界存在于分散的大分子和液体之间。一些单相凝胶由合成大分子(例如卡波姆)或由天然树胶(例如黄芪胶)制备。在一些实施方式中，单相凝胶通常是含水的，但也将使用酒精和油制造。双相凝胶由小分立粒子的网络组成。

[0256] 凝胶也被分类为疏水或亲水的。在某些实施方式中，疏水凝胶的基由具有聚乙烯的液体石蜡或使用胶态氧化硅胶化的脂油或铝或锌皂组成。相反，疏水凝胶的基通常由水、

水凝胶或使用适当的凝胶剂(例如黄芪胶、淀粉、纤维素衍生物、聚羧乙烯和镁铝硅酸盐)胶化的丙二醇组成。在某些实施方式中，本文公开的成分或设备的流变学是准塑料的、塑料的、触变的或膨胀的。

[0257] 适当的水凝胶包括从胶原质、透明质酸盐、纤维蛋白、褐藻酸盐、琼脂糖、几丁糖和其组合得到的水凝胶。在其他的实施方式中，适当的水凝胶是合成聚合物。在另外的实施方式中，适当的水凝胶包括从聚(丙烯酸)及其衍生物、聚(乙烯氧化物)及其共聚物、聚(乙烯醇)、聚磷腈和其组合得到的水凝胶。在各种特定的实施方式中，支持材料选自：水凝胶、NovoGel^{TM}、琼脂糖、明胶、Matrigel^{TM}、聚羟亚烃、缩氨酸、聚(异丙基N聚丙烯酰胺)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-DA)、甲基丙烯酸羟乙酯、聚二甲硅氧烷、聚丙烯酰胺、聚(乳酸)、硅、丝或其组合。

[0258] UV交联水凝胶

[0259] 适当的水凝胶包括甲基丙烯酸酯水凝胶，例如基于聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-DA)的水凝胶，其由于它们在UV光存在的情况下铰链的能力并由于它们对细胞的惰性而在细胞生物学中被使用。PEG-DA通常用作在组织工程中的支架，因为聚合作用在室温下快速出现并需要低能输入，具有高水含量，是弹性的，并可被定制以包括各种生物分子。

[0260] 光敏引发剂

[0261] 在一些实施方式中，挤压复合物包括光敏引发剂，其为当在特定的波长下吸收光时产生能够促进聚合作用或缩聚反应的反应性物质的分子。这些反应区域也被称为光聚作用或辐射固化。光敏引发剂一般是酮，其包含芳香和羰基族。

[0262] 存在两种类型的光敏引发剂：阳离子和基团光敏引发剂。基团光敏引发剂是水相容的并对包含丙烯酸盐或苯乙烯族起作用。所使用的波长的范围一般是近UV(300nm-400nm)，但在引发剂化学中的最近进展扩展了可被使用的波长的范围。在生物学中使用的光敏引发剂，例如Irgacure 2959、184和651，落在这个类别内。

[0263] 与本文所述的生物油墨和/或支持材料一起使用的适当光敏引发剂是Irgacure 2959(4-(2-hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)ketone)(Glycosan BioSystems公司；盐湖城，犹他州)，由于它与其他Irgacure物质比较的在水中的高溶性和它最小的毒性。当吸收UV光时，Irgacure 2959分离成2个主要基团，其然后与PEG-DA的乙烯基(C=C)族起反应以发起聚合作用。在光聚作用中有三个阶段：光引发作用、传播和终止。在第一步骤期间的反应的速率取决于光敏引发剂的性质(量子场、光敏引发剂效率)和光的强度，而稍后的步骤(传播和终止)是乙烯基键浓度的函数和用于传播和终止的速率常数。

[0264] 热致可逆凝胶

[0265] 在一些实施方式中，基于水凝胶的挤压复合物是热致可逆凝胶(也被称为热响应凝胶或热凝胶)。在一些实施方式中，适当的热致可逆水凝胶在室温下不是液体。在特定的实施方式中，适当水凝胶的凝胶化温度(Tgel)是大约10℃、大约15℃、大约20℃、大约25℃、大约30℃、大约35℃和大约40℃，包括其中的增量。在某些实施方式中，适当水凝胶的Tgel是大约10℃到大约25℃。在一些实施方式中，本文所述的生物油墨(例如包括水凝胶、一种或多种细胞类型和其它添加剂等)在室温下不是液体。在特定的实施方式中，本文所述的生物油墨的凝胶化温度(Tgel)是大约10℃、大约15℃、大约20℃、大约25℃、大约30℃、大约35℃和大约40℃，包括其中的增量。在某些实施方式中，本文所述的生物油墨的Tgel是大约10

℃到大约25℃。

[0266] 由聚氧丙烯和聚氧乙烯组成的聚合物当合并到含水溶液中时形成热致可逆凝胶。这些聚合物具有在可在生物打印机装置中被维持的温度下从液体状态改变到凝胶状态的能力。液体状态到凝胶状态相转变取决于聚合物浓度和溶液中的成分。

[0267] 聚羟亚烃407(Pluronic F-127or PF-127)是由聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物组成的非毒性表面活性剂。其它共聚物包括188(F-68等级)、237(F-87等级)和338(F-108等级)。共聚物的含水溶液在酸、碱金属和金属离子存在的情况下是稳定的。PF-127是具有13,000的平均摩尔质量的一般公式E106P70E106的市场上可买到的聚氧乙烯-聚氧丙烯三嵌段共聚物。可通过将增强聚合物的凝胶化特性的适当的方法进一步将聚合物提纯。它包含大约70%的乙烯氧化物,这说明了其亲水性。其是聚羟亚烃ABA嵌段共聚物系列之一。PF-127具有良好的溶解能力、低毒性,且因此被考虑为适当的挤压复合物。

[0268] 在一些实施方式中,水凝胶和本文所呈现的生物油墨的粘性由所描述的任何装置测量。例如,在一些实施方式中,LVDV-II+CP锥板式粘度计和锥锭CPE-40用于计算水凝胶和生物油墨的粘度。在其它实施方式中,Brookfield(锭和杯)粘度计用于计算水凝胶和生物油墨的粘度。在一些实施方式中,在本文提到的粘度范围是在室温下测量的。在一些实施方式中,在本文提到的粘度范围是在体温下(例如在健康人的平均体温下)测量的。

[0269] 在另外的实施方式中,水凝胶和/或生物油墨特征在于具有在大约500和1,000,000厘泊之间、在大约750和1,000,000厘泊之间、在大约1000和1,000,000厘泊之间、在大约1000和400,000厘泊之间、在大约2000和100,000厘泊之间、在大约3000和50,000厘泊之间、在大约4000和25,000厘泊之间、在大约5000和20,000厘泊之间或在大约6000和15,000厘泊之间的粘度。

[0270] 在一些实施方式中,生物油墨包括适合于连续的生物打印的细胞和挤压复合物。在特定的实施方式中,生物油墨具有大约1500mPa•s的粘度。Pluronic F-127和细胞材料的混合物可适合于连续的生物打印。可选地通过经由在冷(4℃)磷酸盐缓冲盐水(PBS)中连续混合超过48个小时而将Pluronic F-127溶解到30%(w/v)来制备这样的生物油墨。Pluronic F-127也可溶解在水中。使用标准无菌细胞培养技术来培养并扩张细胞。细胞可在例如200g下成聚合体状,并重新悬浮在30%Pluronic F-127中并被抽吸到固定到生物打印机的储器,其中它被允许在从大约10到大约25℃的凝胶化温度下凝固。在生物打印之前的生物油墨的凝胶化是可选的。生物油墨,包括包含Pluronic F-127的生物油墨,可作为液体被分配。

[0271] 在各种实施方式中,Pluronic F-127的浓度可以是具有适当的粘度和/或细胞毒性特性的任何值。Pluronic F-127的适当浓度也可能能够支持重量,同时在被生物打印时保持它的形状。在一些实施方式中,Pluronic F-127的浓度是大约10%、大约15%、大约20%、大约25%、大约30%、大约35%、大约40%、大约45%或大约50%。在一些实施方式中,Pluronic F-127的浓度在大约30%和大约40%之间或在大约30%和大约35%之间。

[0272] 参考图6,在特定的实施方式中,使用连接到具有510μm针的注射器的NovoGen MMX™生物打印机通过PF-127的连续沉积来产生三维结构金字塔形结构。

[0273] 参考图7,在特定的实施方式中,使用连接到具有510μm针的注射器的NovoGen MMX™生物打印机通过PF-127的连续沉积来产生立方体形(左)结构和中空立方体形(右)结

构。

[0274] 在一些实施方式中，生物油墨(例如挤压复合物等)的非细胞组分在使用之前被移除。在另外的实施方式中，非细胞组分例如是水凝胶、表面活性剂多元醇、热响应聚合物、透明质酸盐、褐藻酸盐、胶原质或其它生物相容天然或合成聚合物。在又一些其它实施方式中，通过物理、化学或酶手段移除非细胞组分。在一些实施方式中，非细胞组分的比例保持与在使用的时间的细胞组分相关。

[0275] 在一些实施方式中，细胞被预先处理以增加细胞交互作用。例如，细胞在离心沉淀之后可选地在离心管内部被培养，以便在使生物油墨成形之前增强细胞-细胞交互作用。

[0276] 支持材料

[0277] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的设备、系统和方法。在一些实施方式中，设备包括用于接收并保持可选地包含支持材料的至少一个料盒的一个或多个打印机头。在一些实施方式中，方法包括支持材料的使用。在另外的实施方式中，通过使用本文所述的设备、系统和方法制造的组织和器官包括在制造的时间或其后的支持材料。

[0278] 在一些实施方式中，支持材料能够挤压生长在其内的或迁移到其内的或粘附到其上的细胞。在一些实施方式中，支持材料对营养介质是可渗透的。

[0279] 在一些实施方式中，支持材料的粘度是可改变的。在一些实施方式中，通过修改支持材料的温度来改变支持材料的粘度。在一些实施方式中，通过修改支持材料的压力来改变支持材料的粘度。在一些实施方式中，通过修改支持材料的浓度来改变支持材料的粘度。在一些实施方式中，通过交联(例如通过使用化学交联剂)或光致交联(例如使用紫外光暴露)来改变支持材料的粘度。

[0280] 在一些实施方式中，支持材料的渗透性是可改变的。在一些实施方式中，通过改变支持材料的温度或在支持材料周围的温度来修改支持材料的渗透性。在一些实施方式中，通过使支持材料与修改渗透性的制剂接触来修改支持材料的渗透性。

[0281] 在一些实施方式中，支持材料的柔度(例如弹性或硬度)被修改。在一些实施方式中，通过改变支持材料的温度或在支持材料周围的温度来修改支持材料的柔度。在一些实施方式中，通过使支持材料与修改柔度的制剂接触来修改支持材料的柔度。

[0282] 很多支持材料适合于用在本文所述的方法中。在一些实施方式中，水凝胶(包括本文所述的UV交联和热致可逆水凝胶)是拥有以下一个或多个有利的特性的示例性支持材料：包括非粘着的、生物可相容的、可挤压的、生物可打印的、非细胞的和适当的强度。在一些实施方式中，适当的水凝胶是天然聚合物。在一个实施方式中，约束材料由NovoGel™组成。在另外的实施方式中，适当的水凝胶包括从表面活性剂多元醇(例如Pluronic F-127)、胶原蛋白、透明质酸盐、褐藻酸盐、琼脂糖、几丁糖、衍生物或其组合得到的那些水凝胶。在其它实施方式中，适当的水凝胶是合成聚合物。在另外的实施方式中，适当的水凝胶包括从聚(丙烯酸)及其衍生物、聚(乙烯氧化物)及其共聚物、聚(乙烯醇)、聚磷腈和其组合得到的水凝胶。在各种特定的实施方式中，约束材料选自：水凝胶、NovoGel™、琼脂糖、褐藻酸盐、明胶、Matrigel™、透明质烷、聚羟亚烃、缩氨酸水凝胶、聚(异丙基N聚丙烯酰胺)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-DA)、甲基丙烯酸羟乙酯、聚二甲硅氧烷、聚丙烯酰胺、聚(乳酸)、硅、丝或其组合。

[0283] 在一些实施方式中，支持材料在存在于生物打印机中之前包含细胞。在一些实施

方式中，支持材料是包含细胞的悬液的水凝胶。在一些实施方式中，支持材料是包含多于一种细胞类型的混合物的水凝胶。

[0284] 支持材料的示例性使用

[0285] 在一些实施方式中，支持材料用作用于构造生物结构(例如细胞结构、组织、器官等)的构建单元。在另外的实施方式中，支持材料用于界定并维持期望结构的细胞材料(即中间细胞单元)的畴孔隙。在一些实施方式中，支持材料能够呈现任何形状或尺寸。

[0286] 例如，根据一个实施方式，NovoGel^{TM}溶液(最初在与缓冲液和水混合的粉末相中)可被加热以减小其粘度并被吸入具有期望尺寸的微量加液管中(或通过活塞的负位移在期望形状的室内)。可例如通过在吸液管(或室)的外部上的加压气流或将微量吸液管插入具有冷液体的容器内来将在吸液管(或室)中的NovoGel^{TM}溶液冷却到室温，使得它可凝固成具有期望形状的凝胶，即支持材料。因而产生的支持材料可选地在特定细胞结构、组织或器官的构造期间从吸液管或室被分配。见例如图5。

[0287] 在一些实施方式中，支持材料用于在生物打印之后增加工程组织或器官的粘度。在另外的实施方式中，支持材料通过约束材料(例如支持材料)的临时或半永久网格提供在组织或器官和营养介质之间的直接接触。在一些实施方式中，组织被约束在多孔或有间隙的材料中。组织或启光的至少一些细胞对营养物的直接接近增加了组织或器官的生存能力。

[0288] 在另外的实施方式中，本文公开的方法包括用于增加工程组织或器官的生存能力的额外和可选的步骤包括：1)在放置粘着的多细胞聚集体之前可选地分配约束材料(例如支持材料)的基层；2)可选地分配约束材料的周长；3)生物打印在被界定的几何结构内的组织的细胞；以及4)在约束材料中引入间隙的图案例如网格、网孔或栅格中分配覆盖在分生组织上面的约束材料的细长主体(例如圆柱体、带等)。

[0289] 在一些实施方式中，覆盖在图案上面的间隙均匀地或实质上均匀地分布在组织或器官的表面周围。在其它实施方式中，间隙非均匀地分布，由此，组织或器官的细胞非均匀地暴露于营养物。在非均匀实施方式中，对营养物的有差别的接近可选地用于影响组织或器官的一个或多个特性。例如，使在生物打印的细胞结构、组织或器官的一个表面上的细胞比在另一表面上的细胞更快地繁殖可能是合乎需要的。在一些实施方式中，组织或器官的不同部分对营养物的暴露可在不同的时间改变以影响组织或器官朝着期望端点的发展。

[0290] 在一些实施方式中，在任何适当的时间，包括但不限于，紧接着在生物打印之后(例如在10分钟内)、在生物打印之后(例如在10分钟之后)、在细胞实质上粘着到彼此之前、在细胞实质上粘着到彼此之后、在细胞产生细胞外基质之前、在细胞产生细胞外基质之后、刚好在使用之前等，移除约束材料。在各种实施方式中，通过任何适当的方法移除约束材料。例如在一些实施方式中，约束材料被切除、从细胞拉出、消化或溶解。

[0291] 用于校准生物打印机料盒的位置的方法和系统

[0292] 在某些实施方式中，本文公开了用于制造组织和器官的生物打印机。在一些实施方式中，附接到生物打印机的料盒包括生物油墨和/或支持材料。在一些实施方式中，生物打印机将生物油墨或支持材料分配在特定的图案中和在特定的位置处，以便形成特定的组织结构。在一些实施方式中，包括生物油墨的料盒是用后即可丢弃的。在一些实施方式中，料盒在内容物的挤压、分配或沉积之后从生物打印机突出。在一些实施方式中，新料盒附接

到生物打印机。

[0293] 为了制造复杂的结构，本文公开的生物打印机以适当的可重复准确度从料盒分配生物油墨和/或支持材料。在各种实施方式中，适当的可重复准确度包括在任何轴上的大约±5、10、20、30、40或50μm的可重复准确度。在一些实施方式中，本文公开的生物打印机以大约±20μm的可重复准确度从料盒分配生物油墨和/或支持材料。然而，在一些实施方式中，由于料盒的移除和插入，打印机头(和因而料盒)相对于组织结构的位置改变。因此，存在对精确地校准打印机头、料盒和分配孔口相对于打印机台、接收表面、组织或器官的位置的方法的需要。

[0294] 在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括至少一个激光器的使用。在另外的实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括第一激光器和第二激光器的使用。在又一些另外的实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括第一激光器和第二激光器以及一个或多个摄像机的使用。在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括至少一个激光器和至少一个摄像机。在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括至少一个摄像机。

[0295] 在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括手动(例如视觉)校准。

[0296] 在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括基于图像的校准。在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括一个或多个摄像机。

[0297] 在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括手动校准和激光校准。在一些实施方式中，校准打印机头的位置的方法包括手动校准、基于图像的校准和激光校准。

[0298] 在一些实施方式中，沿着一个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，沿着两个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，沿着三个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。

[0299] 在一些实施方式中，通过使用至少一个激光器来进行校准。在另外的实施方式中，通过使用第一激光器和第二激光器来进行校准。在又一些另外的实施方式中，通过使用第一激光器和第二激光器以及一个或多个摄像机来进行校准。在一些实施方式中，通过使用至少一个摄像机来进行校准。

[0300] 用于使用水平激光器进行校准的方法

[0301] 在某些实施方式中，本文公开了校准包括分配孔口的打印机头的位置的方法。在一些实施方式中，本文公开的方法还包括激活激光器并产生至少一个实质上稳定的和/或实质上静止的激光束，以及其中所述激光束对地面是水平的。见例如图1。

[0302] 在一些实施方式中，方法包括沿着至少一个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，方法包括沿着至少两个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，方法包括沿着至少三个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，方法包括：(a)沿着y轴校准打印机头的位置；(b)沿着x轴校准打印机头的位置；和/或(c)沿着z轴校准打印机头的位置；其中每个轴相应于在笛卡尔坐标系中的相同名称的轴。在一些实施方式中，通过使用至少一个激光器来进行校准。在一些实施方式中，通过使用第一激光器和第二激光器来进行校准。在一些实施方式中，通过额外使用至少一个摄像机来进行校准。

[0303] 在一些实施方式中，沿着y轴校准打印机头的位置包括：(a)定位打印机头，使得打

印机头(i)位于第一y八分圆中以及(ii)分配孔口在激光束的上界限之下;(b)朝着激光束移动打印机头并且激光束一被打印机头中断就停止所述运动,其中激光束被打印机头中断时的位置是第一y位置;(c)重新定位打印机头,使得打印机头位于第二y八分圆中以及分配孔口在激光束的上界限之下;(d)朝着激光束移动打印机头并且激光束一被打印机头中断就停止所述运动,其中激光束被打印机头中断时的位置是第二y位置;(e)以及计算在第一y位置和第二y位置之间的中点。

[0304] 在一些实施方式中,沿着x轴校准打印机头的位置包括:(a)将打印机头定位(i)在第一y位置和第二y位置之间的中点处,以及(ii)在激光器的传感器界限之外;以及(b)朝着传感器界限移动打印机头并且打印机头一接触传感器界限就停止所述运动;其中打印机头接触传感器时的增加了打印机头宽度的一半的位置是x位置。

[0305] 在一些实施方式中,沿着y轴校准打印机头的位置包括:(a)定位打印机头,使得激光束可测量打印机头的一侧的精确位置;(b)定位打印机头,使得激光束可测量打印机头的相对侧的精确位置;(c)以及计算在每次测量期间打印机头相对于激光器位置和所测量的距离的中点位置。

[0306] 在一些实施方式中,沿着x轴校准打印机头的位置包括:(a)定位打印机头,使得激光束可测量打印机头的一侧的精确位置;(b)定位打印机头,使得激光束可测量打印机头的相对侧的精确位置;(c)以及计算在每次测量期间打印机头相对于激光器位置和所测量的距离的中点位置。

[0307] 在一些实施方式中,沿着z轴校准打印机头的位置包括:(a)定位打印机头,使得分配孔口位于激光束之上;以及(b)朝着激光束移动打印机头并且激光束一被打印机头中断就停止所述运动,其中激光束被打印机头中断时的位置是z位置。

[0308] 用于使用垂直激光腔进行校准的方法

[0309] 在某些实施方式中,本文公开了校准包括分配孔口的打印机头的位置的方法。在一些实施方式中,本文公开的方法还包括激活激光器并产生至少一个实质上稳定和/或实质上静止的激光束,以及其中所述激光束垂直于地面。见例如图2。在一些实施方式中,本文公开的方法还包括至少一个摄像机的使用。

[0310] 在一些实施方式中,方法包括沿着至少一个轴校准打印机头的位置,其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中,方法包括沿着至少两个轴校准打印机头的位置,其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中,方法包括沿着至少三个轴校准打印机头的位置,其中轴选自x轴、y轴和z轴。

[0311] 在一些实施方式中,方法包括:(a)沿着y轴校准打印机头的位置;(b)沿着x轴校准打印机头的位置;和(c)沿着z轴校准打印机头的位置;其中每个轴相应于在笛卡尔坐标系中的相同名称的轴。

[0312] 在一些实施方式中,沿着y轴校准打印机头的位置包括:(a)定位打印机头,使得打印机头(i)位于第一y八分圆中以及(ii)分配孔口在激光器的传感器界限之外;(b)朝着激光束移动打印机头并且激光束一被打印机头中断就停止所述运动,其中激光束被打印机头中断时的位置是第一y位置;(c)重新定位打印机头,使得打印机头位于第二y八分圆中以及分配孔口在激光器的传感器界限之外;(d)朝着激光束移动打印机头并且激光束一被打印机头中断就停止所述运动,其中激光束被中断时的位置是第二y位置;(e)以及计算在第一y

位置和第二y位置之间的中点。

[0313] 在一些实施方式中，沿着x轴校准打印机头的位置包括：(a)将打印机头定位(i)在第一y位置和第二y位置之间的中点处，以及(ii)在激光器的传感器界限之外；以及(b)朝着传感器界限移动打印机头并且打印机头一接触传感器界限就停止所述运动；其中打印机头接触传感器时的增加了打印机头宽度的一半的位置是x位置。

[0314] 在一些实施方式中，沿着z轴校准打印机头的位置包括：(a)定位打印机头，使得分配孔口位于激光束之上，使得其刚好在激光器传感器范围阈值之外；以及(b)降低打印机头，直到达到传感器阈值，其中激光器传感器阈值被达到时的位置是z位置。在一些实施方式中，步骤(a)和(b)在打印机头的多个点处重复，且所测量的高度被取平均以确定z位置。

[0315] 在一些实施方式中，沿着z轴校准打印机头的位置包括：(a)定位打印机头，使得激光束可测量在打印机头的底部上的一个或多个点的精确位置；(b)基于激光位置和已知的所测量的距离来计算打印机头的绝对或平均位置。

[0316] 用于使用垂直和水平激光器进行校准的方法

[0317] 在某些实施方式中，本文公开了校准包括分配孔口的打印机头的位置的方法，其中打印机头附接到生物打印机，方法包括沿着至少一个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，方法包括沿着至少两个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。在一些实施方式中，方法包括沿着至少三个轴校准打印机头的位置，其中轴选自x轴、y轴和z轴。

[0318] 在一些实施方式中，方法包括：(a)沿着y轴校准打印机头的位置；(b)沿着x轴校准打印机头的位置；以及(c)沿着z轴校准打印机头的位置；其中每个轴相应于在笛卡尔坐标系中的相同名称的轴。

[0319] 在一些实施方式中，校准包括第一激光器和第二激光器的使用。在一些实施方式中，第一激光器是垂直激光器而第二激光器是水平激光器。在一些实施方式中，校准还包括至少一个摄像机的使用。

[0320] 用于使用激光器进行校准的系统

[0321] 在某些实施方式中，本文公开了用于校准包括分配孔口的打印机头的位置的系统，其中料盒附接到生物打印机，所述系统包括：用于沿着至少一个轴校准料盒的位置的装置，其中轴选自y轴、x轴和z轴。

[0322] 在某些实施方式中，本文还公开了用于校准包括分配孔口的打印机头的位置的系统，其中打印机头附接到生物打印机，所述系统包括：用于沿着x轴校准打印机头的位置的装置；用于沿着y轴校准打印机头的位置的装置；以及用于沿着z轴校准打印机头的位置的装置。

[0323] 在一些实施方式中，用于校准打印机头的位置的系统包括用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的装置。在一些实施方式中，用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的装置是激光对准、光学对准、机械对准、压电对准、磁性对准、电场或电容对准、超声对准、基于图像的对准或其组合。

[0324] 在一些实施方式中，用于校准打印机头的位置的系统包括用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的装置。在一些实施方式中，用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的装置是激光对准。在一些实施方式中，激光对准装置包括至少一个激光器。在一些实施方式中，激

光对准装置包括多个激光器。在一些实施方式中，用于校准打印机头的位置的系统还包括用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的位置的额外装置。在一些实施方式中，用于沿着x轴、y轴和z轴校准打印机头的装置是使用至少一个摄像机的基于图像的对准。

[0325] 在一些实施方式中，激光对准意味着其具有任何适当的准确度。在各种实施方式中，适当的准确度包括在任何轴上的大约±5、10、20、30、40或50μm的准确度。在一些实施方式中，激光对准装置准确到在垂直轴上的±40μm和在水平轴上的±20μm。

[0326] 在一些实施方式中，激光路径在激光源和测量点之间是不间断的。在一些实施方式中，通过使用反射表面或光学透镜将激光路径改变高达179°。在一些实施方式中，激光路径改变90°。在一些实施方式中，水平激光束用于使用反射表面通过反射来测量垂直路径。在一些实施方式中，垂直激光束用于使用反射表面通过反射来测量水平路径。

[0327] 全自动化的三维校准系统

[0328] 在某些实施方式中，本文公开了生物打印机，其包括在生物打印过程之前和在此期间自动确定沉积孔口和打印目标表面的x、y、z坐标的装置。在生物打印过程之前和在此期间的这样的坐标自动三维确定确保生物材料在目标表面处被打印在正确的位置处并使用到目标表面分离距离的最佳分配孔口。在生物打印工作之前沉积孔口和接收表面的频繁更换需要在生物打印开始之前这两个元件的定位的准确确定，以便控制并最大化生物打印质量。在生物打印过程期间沉积孔口和打印目标表面的位置的确定实现目标表面的动态映射。在生物打印过程期间的这样的位置确定是重要的，因为由于表面材料的产品容限或收缩，表面高度可以不如所需的一样均匀，且当在生物油墨层之上的层被沉积到表面上时，表面高度连续地改变。而且，所沉积的生物油墨的每个轨道的厚度的动态测量可选地用作反馈以调节生物打印参数，例如沉积速率、分配孔口/接收表面相对行进速度和打印高度(在沉积孔口和打印目标表面之间的距离)。三维位置确定可选地允许打印机沉积错误检查、板定位错误检查、在生物打印工作期间或之后监控结构变化(例如结构收缩)、对transwell和微量滴定板的自动井中心确定以及自动质量控制监控，特别是使用合并数字摄像机技术。

[0329] 在某些实施方式中，本文公开了自动化生物打印机的三维校准系统，其包括固定到生物打印机的接收表面用于确定生物打印机的沉积孔口的位置的传感器；以及固定到生物打印机的打印机头用于确定与接收表面相关的打印目标表面的位置的传感器；由此，系统计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和打印目标表面之间的距离。在一些实施方式中，三维校准系统包括至少两个激光器：固定到接收表面用于确定沉积孔口的位置的传感器；以及固定到打印机头用于确定接收表面的位置的传感器；由此，系统计算打印高度，打印高度包括在沉积孔口和接收表面之间的距离。

[0330] 在一些实施方式中，传感器选自三角测量传感器、超声距离感测探针和数字摄像机。

[0331] 在一些实施方式中，校准系统具有任何适当的准确度。在各种实施方式中，适当的准确度包括在任何轴上的大约±5、10、20、30、40或50μm的准确度。

[0332] 参考图4，在特定的实施方式中，描绘了具有三角测量传感器的三维校准系统。图4的左手侧示出打印机头，所附接的毛细管被保持在顶端感测三角测量传感器之上。毛细管顶端(沉积孔口)和传感器光束的相对位置改变，以便产生距离与位置的关系的数据文件，可从该数据文件自动确定毛细管中心X、Y坐标和平均顶端高度。图4的右手侧示出在稍后的

时间的打印头，所附接的毛细管被保持在目标打印表面之上。表面感测三角测量传感器光束和目标打印表面的相对位置改变，以便产生距离与位置的关系的数据文件，可从该数据文件构造打印表面的表面图。从这两个传感器得到的信息可组合并用于使生物打印过程自动化，材料的沉积与在沉积孔口和目标打印表面之间的最佳分离一起出现。这个分离可被调节以在整个生物打印过程中使用如上所述被记录的信息来校正表面高度变化。

[0333] 例子

[0334] 下面的特定例子应被解释为仅仅例证性的，且无论如何不以任何方式限制本公开的其余部分。在没有进一步的详细阐述的情况下，认为本领域中的技术人员可基于本文的描述在最完全的程度上利用本发明。

[0335] 例子1：HASMC-HAEC混合细胞圆柱体

[0336] 细胞培养物

[0337] 平滑肌细胞：主要的人类大主动脉平滑肌细胞(HASMC)在被补充有10％胎牛血清(FBS)、100U/ml盘尼西林、0.1mg/ml链霉素、0.25μg/ml的两性霉素B、0.01M的HEPES(都来自Invitrogen公司，Carlsbad，CA)、50mg/L的脯氨酸、50mg/L的甘氨酸、20mg/L的丙氨酸、50mg/L的抗坏血酸和3μg/L的$CuSO_4$(都来自Sigma，St.Louis，MO)的低葡萄糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM；Invitrogen公司，Carlsbad，CA)中在37℃和5％的CO_2下被维持和膨胀。在所有研究中使用在通道4和8之间的HASMC的汇流培养物。

[0338] 内皮细胞：主要的人类大主动脉内皮细胞(HAEC)在被补充有2％FBS、1μg/ml的氢羟肾上腺皮质素、10ng/ml人类表皮生长因子、3ng/ml的碱性纤维母细胞生长因子、10μg/ml的肝素钠、100U/ml的青霉素、0.1mg/ml的链霉素和0.25μg/ml的两性霉素B(都来自nvitrogen Corp.，Carlsbad，CA)的介质200中被维持和膨胀。细胞在37℃和5％的CO_2下在涂有明胶(来自猪血清；Sigma，St.Louis，MO)的组织培养物处理的烧瓶上生长。在所有研究中使用在通道4和8之间的HAEC的汇流培养物。

[0339] NovoGel™模具

[0340] 2％w/v NovoGel™溶液的制备：1g的低熔点NovoGel™被溶解在50ml的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)中。简要地，DPBS和NovoGel™在热板上在持续不断的搅拌的情况下被加热到85℃，直到NovoGel™完全溶解为止。NovoGel™溶液通过蒸汽消毒在125℃下被消毒25分钟。NovoGel™溶液被保持在液相中，只要温度被维持在66.5℃之上。在这个温度之下，相转变出现，NovoGel™溶液的粘度增加且NovoGel™形成固体凝胶。

[0341] NovoGel™模具的制备：使用适合10cm皮氏培养皿的Teflon®模具为细胞圆柱体的温育制造NovoGel™模具。简要地，使用70％乙醇溶液将Teflon®模具预先消毒并使模具受到UV光45分钟。消毒的模具放置在10cm皮氏培养皿(VWR International LLC，West Chester，PA)的顶部上并被牢牢地附接。这个组件(Teflon®模具+皮氏培养皿)垂直地被维持，且45ml的预先加热的无菌2％NovoGel™溶液被倒在Teflon®模具和皮氏培养皿之间的空间中。组件可接着在室温下水平地放置1小时以允许NovoGel™的完全凝胶化。在凝胶化之后，Teflon®打印被移除且NovoGel™模具使用DPBS被冲洗两次。17.5ml的HASMC培养基然后被添加到NovoGel™模具。

[0342] HASMC-HAEC圆柱体

[0343] HASMC-HAEC混合细胞圆柱体的制造：为了制备混合细胞圆柱体，HASMC和HAEC被单独地收集并接着以预定比混合。简要地，从汇流培养物烧瓶移除培养基，且使用DPBS(1ml/5cm^{2}的生长区域)冲洗细胞。通过在存在胰蛋白(1ml/15cm^{2}的生长区域)的情况下温育10分钟来从培养物烧瓶的表面分离细胞。使用0.15％胰蛋白分离HASMC，同时使用0.1％胰蛋白分离HAEC。在温育之后，适当的培养基被添加到烧瓶(相对于胰蛋白体积的2X体积)。细胞悬液在200g时被离心沉淀6分钟，之后是浮在表层的溶液的完全移除。细胞聚合体重新悬浮在相应的培养基中并使用血球计进行计数。HASMC和HAEC的适当体积组合以产生包含5％、7.5％、10％、12.5％和15％HAEC(如总细胞群体的a％)的混合细胞悬液。混合细胞悬液在200g时被离心沉淀5分钟，之后是浮在表层的溶液的完全移除。混合细胞聚合体重新悬浮在6ml的HASMC培养基中并转移到20ml细颈瓶，之后是在150rpm下在定轨摇床上和在37℃和5％CO_2下温育60分钟。这允许细胞与彼此聚合并发起细胞间粘附。在温育之后，细胞悬液被转移到15ml离心管并在200g时被离心沉淀5分钟。在浮在表层的介质移除之后，细胞聚合体悬浮在400μl的HASMC培养基中并上下吸几次以确保所有细胞群集被破坏。细胞悬液转移到放置在15ml离心管内部的0.5ml微量离心管内，之后是在2000g时离心沉淀4分钟以形成高度密集和紧凑的细胞聚合体。浮在表层的介质被吸出且细胞通过抽吸被转移到毛细管(OD 1.0mm，ID 0.5mm，L 75mm；Drummond Scientific Co.，Broomall，PA)，以便产生在长度上50mm的细胞圆柱体。在毛细管内部的细胞浆液在37℃和5％CO_2下在HASMC介质中被温育20分钟。细胞圆柱体然后使用被供应有毛细管的柱塞从毛细管沉积到NovoGel^{TM}模具(覆盖有HASMC介质)的凹槽内。细胞圆柱体在37℃和5％的CO_2下被温育24小时和48小时。

[0344] 例子2：多层血管

[0345] 细胞培养物

[0346] 平滑肌细胞：主要的人类大主动脉平滑肌细胞(HASMC；GIBCO)在被补充有10％胎牛血清(FBS)、100U/ml盘尼西林、0.1mg/ml链霉素、0.25μg/ml的两性霉素B、0.01M的HEPES(都来自Invitrogen公司，Carlsbad，CA)、50mg/L的脯氨酸、50mg/L的甘氨酸、20mg/L的丙氨酸、50mg/L的抗坏血酸和3μg/L的$CuSO_4$(都来自Sigma，St.Louis，MO)的低葡萄糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM；Invitrogen公司，Carlsbad，CA)中在37℃和5％的CO_2下被维持和膨胀。在所有研究中使用在通道4和8之间的HASMC的汇流培养物。

[0347] 内皮细胞：主要的人类大主动脉内皮细胞(HAEC)在被补充有2％FBS、1μg/ml的氢羟肾上腺皮质素、10ng/ml的人类表皮生长因子、3ng/ml的基本成纤维细胞生长因子、10μg/ml的肝磷脂、100U/ml盘尼西林和0.1mg/ml链霉素和0.25μg/ml的两性霉素B(都来自Invitrogen公司，Carlsbad，CA)的介质200中被维持和膨胀。细胞在37℃和5％的CO_2下在涂有明胶(来自猪血清)的组织培养物处理的烧瓶上生长。在所有研究中使用在通道4和8之间的HAEC的汇流培养物。

[0348] 成纤维细胞：主要的人类成纤维细胞(HDF)在被补充有2％FBS、1μg/ml的氢羟肾上腺皮质素、10ng/ml的人类表皮生长因子、3ng/ml的基本成纤维细胞生长因子、10μg/ml的肝磷脂、100U/ml盘尼西林和0.1mg/ml链霉素(都来自Invitrogen公司，Carlsbad，CA)的介质106中在37℃和5％的CO_2下被维持和膨胀。在所有研究中使用在通道4和8之间的HDF的汇流培养物。

[0349] NovoGel^{TM}溶液和模具

[0350] 2％和4％w/v NovoGel^{TM}溶液的制备：1g或2g(分别对于2％或4％)的低熔点NovoGel^{TM}(极纯LMP)被溶解在50ml的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)中。简要地，DPBS和NovoGel^{TM}在热板上在持续不断的搅拌的情况下被加热到85℃，直到NovoGel^{TM}完全溶解为止。NovoGel^{TM}溶液通过蒸汽消毒在125℃下被消毒25分钟。NovoGel^{TM}溶液保持在液相中，只要温度被维持在66.5℃之上。在这个温度之下，相转变出现，NovoGel^{TM}溶液的粘度增加且NovoGel^{TM}形成固体凝胶。

[0351] NovoGel^{TM}模具的制备：使用适合10cm皮氏培养皿的Teflon®模具为细胞圆柱体的温育制造NovoGel^{TM}模具。简要地，使用70％乙醇溶液将Teflon®模具预先消毒并使模具受到UV光45分钟。消毒的模具放置在10cm皮氏培养皿的顶部上并牢牢地被附接。这个组件(Teflon®模具+皮氏培养皿)垂直地被维持，且45ml的预先加热的无菌2％NovoGel^{TM}溶液被倒在Teflon®模具和皮氏培养皿之间的空间中。组件可接着在室温下水平地放置1小时以允许NovoGel^{TM}的完全凝胶化。在凝胶化之后，Teflon®打印被移除且NovoGel^{TM}模具使用DPBS被冲洗两次。然后17.5ml的HASMC培养基被添加到NovoGel^{TM}模具用于温育HASMC-HAEC混合细胞圆柱体或17.5ml的HDF培养基被添加到NovoGel^{TM}模具用于温育HDF细胞圆柱体。

[0352] 细胞圆柱体

[0353] HASMC-HAEC混合细胞圆柱体的制造：为了制备混合细胞圆柱体，HASMC和HAEC被单独地收集并接着以预定比混合。简要地，从汇流培养物烧瓶移除培养基，且使用DPBS(1ml/5cm^{2}的生长区域)冲洗细胞。通过在存在胰蛋白(1ml/15cm^{2}的生长区域)的情况下温育10分钟来从培养物烧瓶的表面分离细胞。使用0.15％胰蛋白分离HASMC，同时使用0.1％胰蛋白分离HAEC。在温育之后，适当的培养基被添加到烧瓶(相对于胰蛋白体积的2X体积)。细胞悬液在200g时被离心沉淀6分钟，之后是浮在表层的溶液的完全移除。细胞聚合体重新悬浮在相应的培养基中并使用血球计进行计数。HASMC和HAEC的适当体积组合以产生包含15％HAEC和其余85％HASMC(作为总细胞群体的百分比)的混合细胞悬液。混合细胞悬液在200g时被离心沉淀5分钟，之后是浮在表层的溶液的完全移除。混合细胞聚合体重新悬浮在6ml的HASMC培养基中并转移到20ml细颈瓶，之后是在150rpm下在定轨摇床上和在37℃和5％的CO_2下温育60分钟。这允许细胞彼此聚合并发起细胞间粘附。在温育之后，细胞悬液被转移到15ml离心管并在200g时被离心沉淀5分钟。在浮在表层的介质移除之后，细胞聚合体重新悬浮在400μl的HASMC培养基中并上下吸几次以确保所有细胞群集被破坏。细胞悬液转移到放置在15ml离心管内部的0.5ml微量离心管内，之后是在2000g时离心沉淀4分钟以形成高度密集和紧凑的细胞聚合体。浮在表层的介质被吸出且细胞通过抽吸被转移到毛细管(OD 1.0mm，ID 0.5mm，L 75mm)，以便产生在长度上50mm的细胞圆柱体。在毛细管内部的细胞浆液在37℃和5％的CO_2下在HASMC介质中被温育20分钟。细胞圆柱体然后使用被供应有毛细管的柱塞从毛细管沉积到NovoGel^{TM}模具(覆盖有HASMC介质)的凹槽内。细胞圆柱体在37℃和5％的CO_2下被温育24小时。

[0354] HDF细胞圆柱体的制造：使用类似于制备HASMC-HAEC混合细胞圆柱体的方法制备HDF圆柱体。简要地，从汇流HDF培养物烧瓶移除培养基，且使用DPBS(1ml/5cm^{2}的生长区域)冲洗细胞。通过在存在胰蛋白(0.1％；1ml/15cm^{2}的生长区域)的情况下温育10分钟来从培养物烧瓶的表面分离细胞。在温育之后，HDF培养基被添加到烧瓶(相对于胰蛋白体积的2X

体积)。细胞悬液在200g时被离心沉淀6分钟，之后是浮在表层的溶液的完全移除。细胞聚合体重新悬浮在6ml的HDF培养基中并被转移到20ml细颈瓶，后面是在150rpm下在定轨摇床上和在37℃和5％的CO_2下温育75分钟。在温育之后，细胞悬液被转移到15ml离心管并在200g时被离心沉淀5分钟。在浮在表层的介质移除之后，细胞聚合体重新悬浮在400μl的HDF培养基中并上下吸几次以确保所有细胞群集被破坏。细胞悬液转移到放置在15ml离心管内部的0.5ml微量离心管内，之后是在2000g时离心沉淀4分钟以形成高度密集和紧凑的细胞聚合体。浮在表层的介质被吸出且细胞通过抽吸被转移到毛细管(OD 1.0mm，ID 0.5mm，L 75mm)，以便产生在长度上50mm的细胞圆柱体。在毛细管内部的细胞浆液在37℃和5％的CO_2下在HDF介质中被温育20分钟。细胞圆柱体然后从毛细管沉积到NovoGel™模具(覆盖有HDF介质)的凹槽内。细胞圆柱体在37℃和5％的CO_2下被温育24小时。

[0355] 多层血管的制造

[0356] NovoGel™底板的制备：通过将10ml的预先加热的(>40℃)NovoGel™(2％w/v)分配到10cm皮氏培养皿内来制造NovoGel™底板。紧接着在分配之后，NovoGel™均匀地散布以便覆盖培养皿的整个底部并形成均匀的层。皮氏培养皿在室温下被温育20分钟以允许NovoGel™完全胶化。

[0357] 多层血管：利用HDF圆柱体和HASMC-HAEC混合细胞圆柱体来制造由HDF的外层和HASMC-HAEC的内层组成的血管。利用如图5所示的几何布置。简要地，在24小时温育期结束时，成熟的HDF和HASMC-HAEC混合圆柱体被抽吸回到毛细管内并放置在适当的培养基中，直到将来使用为止。如下制备由NovoGel™棒组成的支持结构：预先加热的2％NovoGel™被抽吸到毛细管(L＝50mm)内并在冷PBS溶液(4℃)中快速冷却。5cm长的凝胶状NovoGel™圆柱体从毛细管沉积(使用柱塞)并直接搁置在NovoGel™底板上。第二NovoGel™圆柱体联接到第一NovoGel™圆柱体，且该过程重复，直到10个NovoGel™圆柱体被沉积以形成第一层为止。此时，20μl的PBS分配在NovoGel™圆柱体之上以保持它们湿润。另外六个NovoGel™圆柱体在如图5中所示的位置(第2层)处沉积在第1层的顶部上。三个HDF圆柱体然后沉积在位置4、5和6处以完成第2层。在分配每个HDF圆柱体之后，40μl的HDF培养基被分配在所沉积的圆柱体的顶部上以帮助随后的圆柱体的沉积以及防止细胞圆柱体的脱水。第3层的接下来的NovoGel™圆柱体被沉积，之后是在位置3和6处的HDF圆柱体。在用HDF培养基重新润湿结构之后，HASMC-HAEC混合圆柱体搁置在位置4和5上。随后，40μl的HASMC介质和40μl的HDF介质被分配在细胞圆柱体的顶部上。通过将NovoGel™圆柱体沉积在位置1和7处、将HDF圆柱体沉积在位置2和6处、将HASMC-HAEC混合圆柱体沉积在位置3和5处以及最后将4％NovoGel™圆柱体沉积在位置4处来完成第4层。类似地通过将NovoGel™圆柱体、之后是HDF圆柱体和最后HASMC-HAEC圆柱体搁置在图5所示的位置处来完成第5、6和7层。一旦整个结构被完成，0.5ml的温NovoGel™就被分配在结构的每端上并被允许在室温下凝胶化5分钟。在该NovoGel™的凝胶化之后，30ml的HASMC介质被添加到皮氏培养皿(以确保整个结构被完全浸没)。结构在37℃和5％的CO_2下被温育24小时并允许在细胞圆柱体之间的熔合。

[0358] 在24小时结束时，从熔合的多层血管移除周围的NovoGel™支持结构。

[0359] 例子3：生物打印机

[0360] 组装生物打印机。生物打印机包含具有用于保持料盒的套爪卡盘夹和用于分配料盒的内容物的活塞的打印机头。所使用的料盒是具有75-85mm的长度的玻璃微毛细管。每当

需要生物油墨或支持材料时，将新毛细管装入。

[0361] 为了打印结构，在打印过程的持续时间期间、即当新毛细管被装入打印机头内时需要±20μm的分配位置可重复性。为了维持所有装入的毛细管相对于在x、y和z方向上的同一点的可重复性，生物打印机包含用于校准微毛细管的位置的激光校准系统。激光校准系统将所有毛细管顶端的位置校准到公共参考位置。所有打印是相对于该参考位置来进行移动的。

[0362] 通过使用单激光距离测量传感器来校准所有三个轴(x、y和z轴)。系统包含激光传感器和激光束。传感器阈值是激光传感器的最大感测距离。传感器配置成忽略更远离预定阈值的所有信号。传感器使用三角测量来确定到物体(毛细管顶端)的距离。激光传感器使用垂直向上(+z轴)瞄准的光束来进行定向。

[0363] 垂直激光校准

[0364] 对于在x轴上的校准：毛细管顶端在激光传感器的范围内移动，顶端在激光束的左边(-x)。毛细管在+x方向上移动直到传感器检测到毛细管边缘为止，且该位置被记录。上述步骤从相对侧重复(即顶端位于激光束的右边(+x)并在-x方向上移动直到传感器检测到毛细管边缘为止)。来自这两个步骤的位置被取平均以计算毛细管的中点。可选地，上述过程对不同的y位置重复且所计算的中点被取平均。

[0365] 对于在y轴上的校准：上述过程(对于x轴)对y轴重复。

[0366] 对于在z轴上的校准：毛细管顶端移动到传感器光束之上，使得光束击中毛细管的底表面，且顶端刚好在传感器范围阈值之外。毛细管被降低直到达到传感器阈值为止，以及该位置被记录为z位置。可选地，上述步骤在毛细管顶端表面上的多个点处重复且所测量的高度被取平均。

[0367] 水平激光校准

[0368] 对于在y轴上的校准：毛细管被移动，使得顶端刚好在激光束高度之下，且毛细管偏离到一侧(在y方向上)。毛细管在y方向上朝着激光器移动。当激光传感器检测到从毛细管反射的光束时毛细管被停止，且这个位置被记录。上述步骤对偏离到激光器的另一侧的毛细管重复，并在y方向上移动。来自上述步骤的中点被记录为y位置。

[0369] 对于在x轴上的校准：使用在y轴上的校准的结果，y轴被移动，使得激光器以毛细管为中心。毛细管移动过传感器阈值并朝着传感器移动。毛细管一越过传感器阈值且传感器输出一改变，毛细管就停止。这个位置加上1/2毛细管宽度(从y校准)被记录为x位置。

[0370] 对于在z轴上的校准 ：毛细管从x位置向上移动，直到它没有激光束为止。毛细管顶端向下朝着激光束移动，并且激光束一被中断(使用与对y轴相同的过程)就停止。这个位置被记录为z位置。

[0371] 毛细管启动注液

[0372] 在从毛细管打印之前，在毛细管内部的生物油墨或支持材料被灌注，使得生物油墨或支持材料将开始在毛细管的最顶端处打印。校准激光器用于灌注毛细管。毛细管顶端移动到刚好在激光束之上，光束集中在y轴上。顶端在激光束之上20-100μm之间。在打印机头中的分配活塞被向下驱动，直到生物油墨或支持材料开始从毛细管顶端分配并中断激光束为止。所分配的生物油墨或支持材料通过在反向方向上驱动活塞(20-100微米)而被抽吸回到毛细管。毛细管然后被灌注并准备分配。

[0373] *NovoGel*®毛细管清洁

[0374] NovoGel®用作支持材料。为了移除粘到毛细管的外表面的过多NovoGel™并避免过多的NovoGel™影响打印质量，过多的NovoGel™被移除。擦拭特征被集成到大的NovoGel®容器内。大的NovoGel®容器配备有具有用于使隔膜被附接的敞开式盖的标准医学小瓶。隔膜配置有在1-2mm厚的硅树脂的中心中的横切。通过透过隔膜将毛细管浸入大的NovoGel®容器内并抽吸NovoGel®，过多的NovoGel®在它离开容器时从毛细管被抹掉并保留在大的容器中。

[0375] 血管结构的打印

[0376] 生物打印机和料盒如上被组装。生物打印机具有台，其具有用于接收由生物打印机产生的结构的皮氏培养皿。皮氏培养皿被涂覆有NovoGel™。

[0377] 血管结构的二维表示(见例如图5)由用户输入到在连接到生物打印机的计算机内的软件程序内。血管结构的二维表示由HASMC-HAEC混合细胞圆柱体、HDF圆柱体的棒和界定血管结构的孔隙并围绕血管结构的NovoGel®棒组成。HASMC-HAEC混合细胞圆柱体和HDF细胞圆柱体如在例子1中被制备并被抽吸到用于插入打印机头的套爪卡盘内的毛细管内。可选地，毛细管被装入打印机头内并浸入大的NovoGel®容器内，且NovoGel®被抽吸到毛细管内。使用垂直激光校准系统来校准毛细管。

[0378] 当来自软件程序的命令被提供到生物打印机时，生物打印机在预定的位置上将在HASMC-HAEC棒、HDF棒和NovoGel®棒之间交替的三维结构打印到皮氏培养皿上。见例子2。在每个棒搁置在皮氏培养皿上之后，使用少量培养基润湿棒。一旦整个结构完成，温NovoGel®就分配在结构的每端之上并被允许在室温下凝胶化，且细胞培养基被添加到皮氏培养皿以浸没整个结构。然后在37℃和5％的CO_2下温育该结构以允许在细胞圆柱体之间的熔合。在温育时间结束时，从熔合的多层血管移除周围的NovoGel®支持结构。

[0379] 例子4：UV交联PEG-DA的生物打印

[0380] 在水中的10％(w/v)PEG-DA(Glycosan BioSystems有限公司；盐湖城，犹他州)的溶液与固化剂(0.1％w/v PEGcure光敏引发剂)(Glycosan BioSystems有限公司；盐湖城，犹他州)混合。因而产生的溶液保持远离在生物打印机中的小瓶室中的光。这个溶液然后使用300μm或500μm尺寸的玻璃保密性经由挤压方法被抽吸并暴露于UV光(波长365nm，强度15,000-20,000μW/cm^2)至少3分钟以允许聚合作用经由交联来出现。交联将液体水凝胶转换成半固体结构。半固体水凝胶在有或没有细胞的情况下是可生物打印的并用于产生在几何上复杂的结构，例如薄板、囊、管、导管、圆柱体、组织、器官等。

[0381] 具有细胞的交联PEG-DA

[0382] 在各种应用中，PEG-DA用于在从生物打印机挤压出之前封装细胞、蛋白质或其它生物材料。对于包括细胞的UV交联材料(例如PEG-DA等)被生物打印的应用，衰减滤波器被添加到UV模块以实现减小的UV光强。在一个应用中，PEG-DA在对完全交联不是最佳的强度和/或曝光时间下暴露于UV光。在特定的情况下，包括哺乳动物细胞的PEG-DA暴露于具有800mW/cm2的强度的UV光和在远离PEG-DA材料2英寸的距离处的UV源。可选地通过改变UV交联材料和光敏引发剂的成分来控制交联的程度。见表2。

[0383] 表2

[0384]

成分	比	UV暴露	结果
5％PEGDA+5％Irgacure 2959	1:100/1:50	6分钟	<50％交联的
5％PEGDA+15％Irgacure 2959	1:100/1:50	6分钟	<75％but>50％交联的
5％PEGDA+5％/15％Irgacure	1:25	6分钟	100％交联的

[0385] 生物打印机然后在由PEG-DA部分或完全地封装细胞的结构中打印连续的PEA-DA和细胞的层。最后，整个结构进一步暴露于UV以促进在细胞周围的PEG-DA的完全交联。该过程可选地用于封装在液体中或半固体状态的其他类型的生物材料。

[0386] 没有细胞的交联PEG-DA

[0387] 在另一应用中，PEG-DA用作支架的基础，细胞和其它材料被生物打印在该支架上。在暴露于UV光的情况下经由机械模塑产生预先形成的PEG-DA结构。例如，PEG-DA溶解在50mM Tris HCL缓冲液中并使用在1:250稀释比下的5％Irgacure 2959进行交联。具有800mW/cm^{2}的强度的长波UV光(即365nm)用来在5分钟的暴露中实现完全的交联。所执行的PEG-DA结构放置在生物打印机中，且细胞和其它材料被打印到结构上。一旦细胞被打印，它们就被允许熔合且PEG-DA支架随后被移除。这种技术能够产生以器官(例如膀胱)的形状和其它复杂形状的细胞结构。

[0388] 例子5:UV交联甲基丙烯酸酯水凝胶的生物打印

[0389] 使用下面的参数从包括UV模块的NovoGen MMX^{TM}生物打印机生物打印交联甲基丙烯酸酯水凝胶：

[0390] •水凝胶浓度:5％

[0391] •Irgacure 2959浓度:0.5％

[0392] •UV强度:1.50W/cm^2

[0393] •UV暴露时间:15秒

[0394] •分配高度:0.5mm(使用500μm毛细管的1xD)

[0395] 可选地，结合较低的UV强度来使用较长的暴露时间。因为一些甲基丙烯酸酯水凝胶膨胀到比抽吸量长大约40％的可生物打印的长度，可变泵速分配命令被配置成以比实际机器人轴运动更慢的速度从分配泵分配较短长度的材料。为了在+Y轴上以2mm/sec打印甲基丙烯酸酯水凝胶的50mm长的片，进行下面的计算以确定要抽吸的正确数量的材料和相应的泵速以导致50mm线：

[0396] •计算要抽吸的甲基丙烯酸酯水凝胶的数量:50mm/1.4＝35.71mm

[0397] •计算泵速:2mm/sec/1.4＝1.43mm/sec

[0398] 生物打印机软件脚本命令被如下配置：

[0399] •抽吸35.71mm的流体并接着移动到UV暴露室15秒。

[0400] •在0.5mm的分配高度下将凝胶毛细管移动到零点。

[0401] •在Y轴上以2mm/sec的速度移动机器人50mm并以1.43mm/sec的速度移动凝胶分配泵35.71mm。凝胶泵和Y轴应同时停止，导致50mm线。

[0402] 例子6:同轴喷嘴——变化的流速

[0403] 喷嘴修改允许细胞类型、材料和/或细胞的混合物的空间划分。这个实验研究以各

种流速通过喷嘴挤压的给定粘度的典型化合物的使用以便评估用于由于体积流出失配而最小化套层-核心混合的最佳条件。喷嘴的规范如下：用于核心层的生物油墨流动的喷嘴的内径：150μm；用于套层的生物油墨流动的喷嘴的内径：500μm；喷嘴的外径：800μm（见图29）。材料最初是染成蓝色的30％P-F127和清澈的30％P-F127。之后，由于蓝色底色的快速扩散标准化，使用具有类似于P-F127的粘度的不透明粘性蛋白质材料。为了正确的套层/核心形成，由裸眼定性地确定评估。下面示出了结果。更高的流速引起流量不稳定性，且因此应被考虑为这个实验的喷嘴和生物油墨的可忍受的流量的上限。

[0404]

	核心流量 (mL/h)	套层流量 (mL/h)	定性结果
1	4	4	核心和套层并排的不对称定位
2	6	4	同轴结构，但套层太薄
3	8	4	套层厚度的良好形成，不对称
4	10	4	不稳定型形式，流量中的摆动

[0405] 使用1％褐藻酸盐作为套层材料、使用包括核心层的典型细胞（NIH3T3）进行后续实验。从最初的实验确定流速。在图30中示出预期批量形态结果（H&E染色），指示紧凑的细胞核心在挤压之后保持完整。

[0406] 这两组试验都展示使用同轴喷嘴生产复杂的双层结构的可行性。到套层和核心的体积流速的变化影响挤压出的组分的形态结果，但利用大约两倍于套层流量的核心流量产生稳定的结果。

[0407] 例子7：同轴喷嘴——血管脉管的打印

[0408] 在仅非细胞材料系统上测试同轴喷嘴的功能（喷嘴的规范：用于核心层的生物油墨流动的喷嘴的内径：514μm；用于套层的生物油墨流动的喷嘴的内径：819μm；喷嘴的外径：3200μm）。通过在经由中心挤压出的包含Novogel的氯化钙周围的外喷嘴来挤压褐藻酸盐明胶。在中心中的氯化钙的存在足以交联外壳。Novegel通过注射器和针的手动使用与PBS一起被冲掉。一旦在仅材料系统中被验证，细胞/褐藻酸盐/明胶混合物就被挤压以产生中空管（内径820μm，外径2300μm）。挤压的细胞/材料管被冲洗以建立开放，并接着被分割成六个50mm的管。管在静止和流动条件下被培养。

[0409] 在随后的实验中，在血管脉管的打印中利用50:50正常人肺成纤维细胞（NHLF）：人肺内皮细胞（HPAEC）生物油墨。假设强氧梯度（在脉管外部高/在脉管内部低）的产生将反转以前看到的不希望有的效应，其中HPAEC在标准调节协议下自动迁移到脉管的管腔表面。结合暴露于空气中的介质利用FC40——氧载体，以便产生在生物反应器中的高氧管腔隔间。前面提到的成分的两个（6x1）脉管在高管腔氧条件下被打印和调节5天。在第5天时，脉管被固定并给予关于组织学的分析。

[0410] 在图31中看到响应于高管腔氧梯度的HAPEC的因而产生的区室化。与以前的结果（在这里未示出）（其指示在缺乏这样的梯度的情况下HPAEC偏好是迁移到脉管的管腔表面并移植脉管的管腔表面）比较，CD31染色清楚地示出HPAEC到脉管的内腔内的大量迁移。

[0411] 这些结果建议，氧梯度方法可用于这个特定的细胞类型(HPAEC)以迫使细胞迁移到内隔间或(在使用反向梯度时)外隔间。可不仅在管状元件或球形元件中而且在其它几何结构中利用将细胞驱动到特定隔间的技术。

[0412] 例子8：同轴喷嘴——使用I-生物油墨的生物打印

[0413] 实验1：

[0414] 使用由70％正常人肺成纤维细胞(NHLF)：20％支气管平滑肌细胞(BSMC)：10％人脂肪衍生的间充质干细胞(ADSC)组成的细胞混合物，500-μm直径生物打印的脉管被产生并在12个小时被定性地评估粘聚力、表面平滑度(正确的生物油墨内熔合的标志)、缩短(收缩)和通过标准生物打印协议(生物油墨间熔合的标志)形成管状结构的能力。在评估之后，脉管被嵌入生物活性水凝胶中并被灌注有脉动流。在生物反应器上的时间之后，具有嵌入的脉管的水凝胶被发送用于组织学检查，其展示预期细胞性和形态学。

[0415] 定性评估不显示与不包含ADSC的类似生物油墨混合物的可识别的差异。生物油墨的表面特征化是平滑和不透明。生物油墨圆柱体当被处理时是有弹力的，指示良好的凝聚。收缩(缩短)是在50％的量级，其对于在圆柱形形状中产生的生物油墨是一致的。三个生物打印的脉管(ID 500μm/OD 1500μm)被熔合并在12个小时是伸展的(即开放和未闭塞的)。在生物反应器上在水凝胶中调节两个代表性脉管3天。组织性评估显示与以前的含非MSC的样本的一致性。在图32中示出嵌入的管状结构和周围水凝胶的示例组织学。

[0416] 实验2：

[0417] 使用两种细胞混合物[50％正常人肺成纤维细胞(NHLF)：40％人肺动脉内皮细胞(HPAEC)：10％人脂肪衍生的间充质干细胞(ADSC)；50％正常人肺成纤维细胞(NHLF)：45％人肺动脉内皮细胞(HPAEC)：5％人脂肪衍生的间充质干细胞(ADSC)]，500-μm直径生物打印的脉管被产生并在12个小时被定性地评估粘聚力、表面平滑度(正确的生物油墨内熔合的标志)、缩短(收缩)和通过标准生物打印协议(生物油墨间熔合的标志)形成管状结构的能力。在生物反应器中灌注代表性样本。为具有对形态的染色(H&E)、编程性细胞死亡(TUNEL)、增殖(ki67)、平滑肌细胞肌动蛋白、内皮标记(CD31)、成纤维细胞标记(TE7)和细胞外基质沉积(三色)的组织学提交来自这些组的样本。

[0418] 定性评估不显示与不包含ADSC的类似生物油墨混合物的可识别的差异。生物油墨的表面特征化是平滑和不透明。生物油墨圆柱体当被处理时是有弹力的，指示良好的凝聚。收缩(缩短)是50％的量级，其对于在圆柱形形状中产生的生物油墨是一致的。最后，四个生物打印的脉管(ID 500μm/OD 1500μm)被熔合并在12个小时是伸展的(即开放和未闭塞的)。由于其异常品质，被装入生物反应器内的两个脉管来自50％NHLF：45％HPAEC：5％ADSC组。使用脉动流来调节出现9天，且脉管在组织学上分析，如上所述。因而产生的组织学定性地显示没有与从没有哺乳动物细胞的生物油墨产生的控制结构的差异。

[0419] 实验3：

[0420] 使用由75％人脂肪衍生的间充质干细胞(ADSC)：25％人动脉内皮细胞(HAEC)组成的细胞混合物，500-μm直径生物打印的脉管被产生并在12个小时被定性地评估粘聚力、表面平滑度(正确的生物油墨内熔合的标志)和缩短(收缩)。这同一个细胞混合物也被评估通过标准生物打印协议(生物油墨间熔合的标志)形成补片结构(5mm x 5mm)的能力。为具有对形态的染色(H&E)和编程性细胞死亡(TUNEL)的组织学提交来自这些组的样本。

[0421] 定性评估不显示与不包含ADSC的类似生物油墨混合物的可识别的差异。生物油墨的表面特征化是平滑和不透明。生物油墨圆柱体当被处理时是有弹力的，指示良好的凝聚。收缩(缩短)是在50％的量级，其对于在圆柱形形状中产生的生物油墨是一致的。最后，四个生物打印的补片(5mm x 5mm)被熔合并在12个小时是伸展的(即开放和未闭塞的)。在2天后为组织学提交补片。在图33中示出示例补片。

[0422] 虽然本发明已经结合了其特定的实施方式进行了描述，将理解的是，创造性方法能够进一步修改。本专利申请意欲涵盖通常遵循本发明的原理的和包括与本公开这样背离的内容的本发明的任何变化、使用或更改，如出现在本发明所属的领域内的已知或惯例实践内的变化、使用或更改，和如可应用于在阐述之前的本文的本质特征的变化、使用或更改，以及如在所附权利要求的范围内遵循的变化、使用或更改。

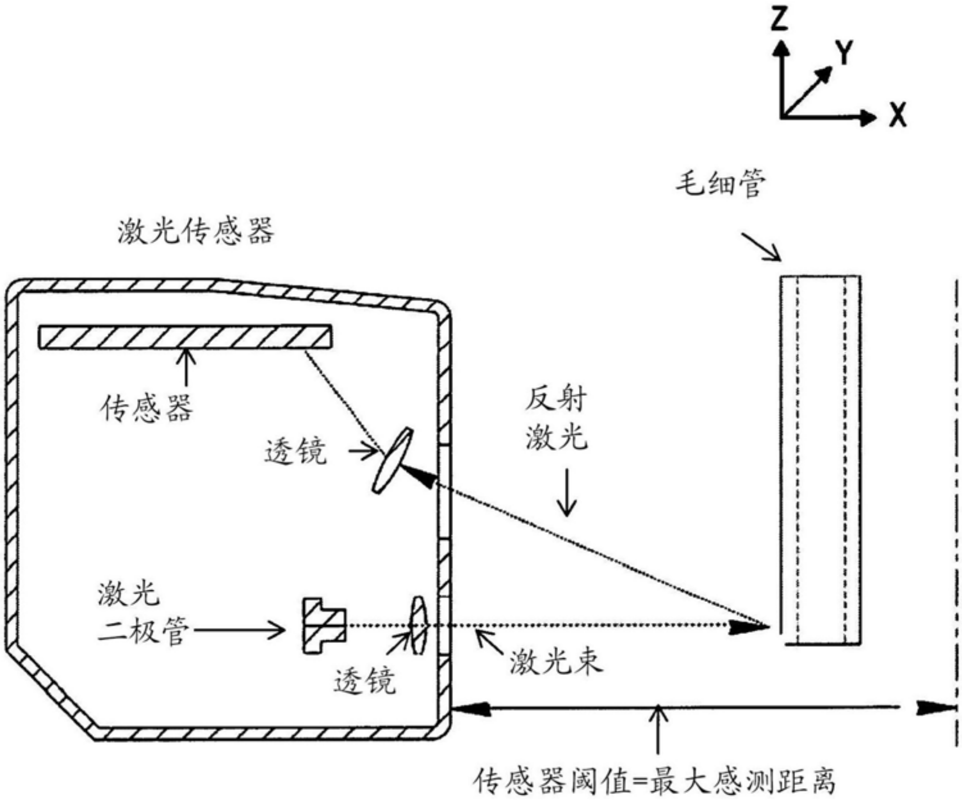

Z
Y
X
毛细管
激光传感器
传感器
透镜
反射
激光
激光
二极管
透镜
激光束
传感器阈值=最大感测距离

图1

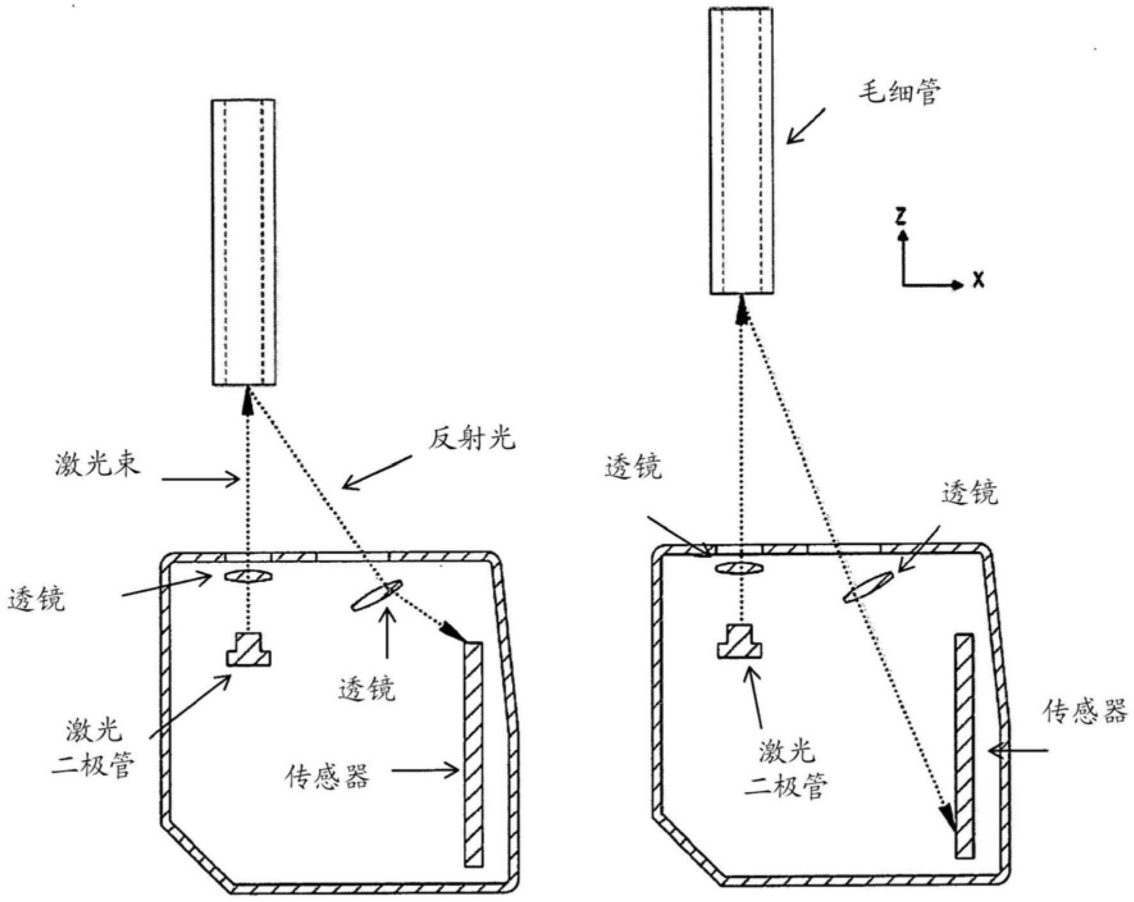

毛细管
Z
X
激光束
反射光
透镜
透镜
透镜
透镜
透镜
激光
二极管
传感器
激光
二极管
传感器

图2

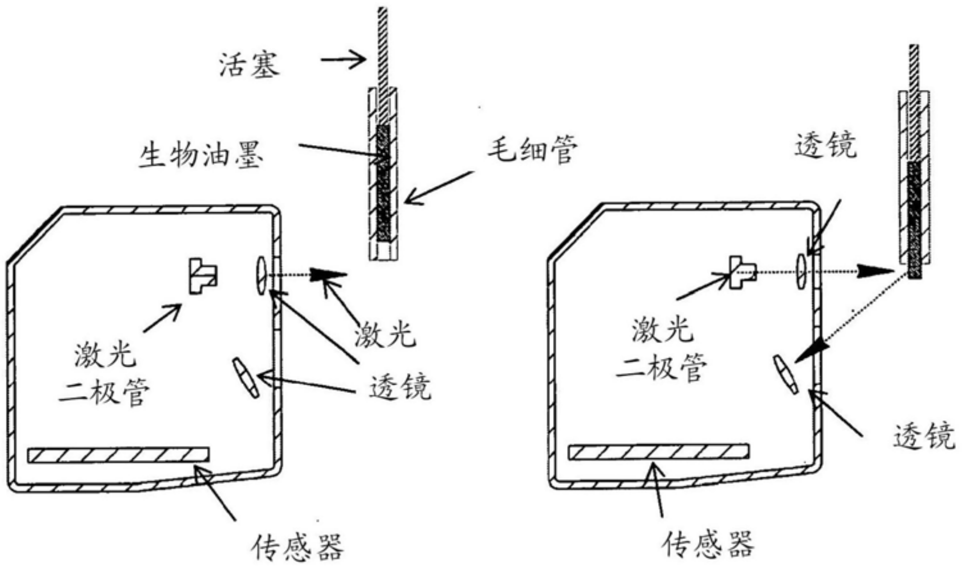

活塞
生物油墨
毛细管
激光
二极管
激光
透镜
传感器
透镜
激光
二极管
透镜
传感器

图3

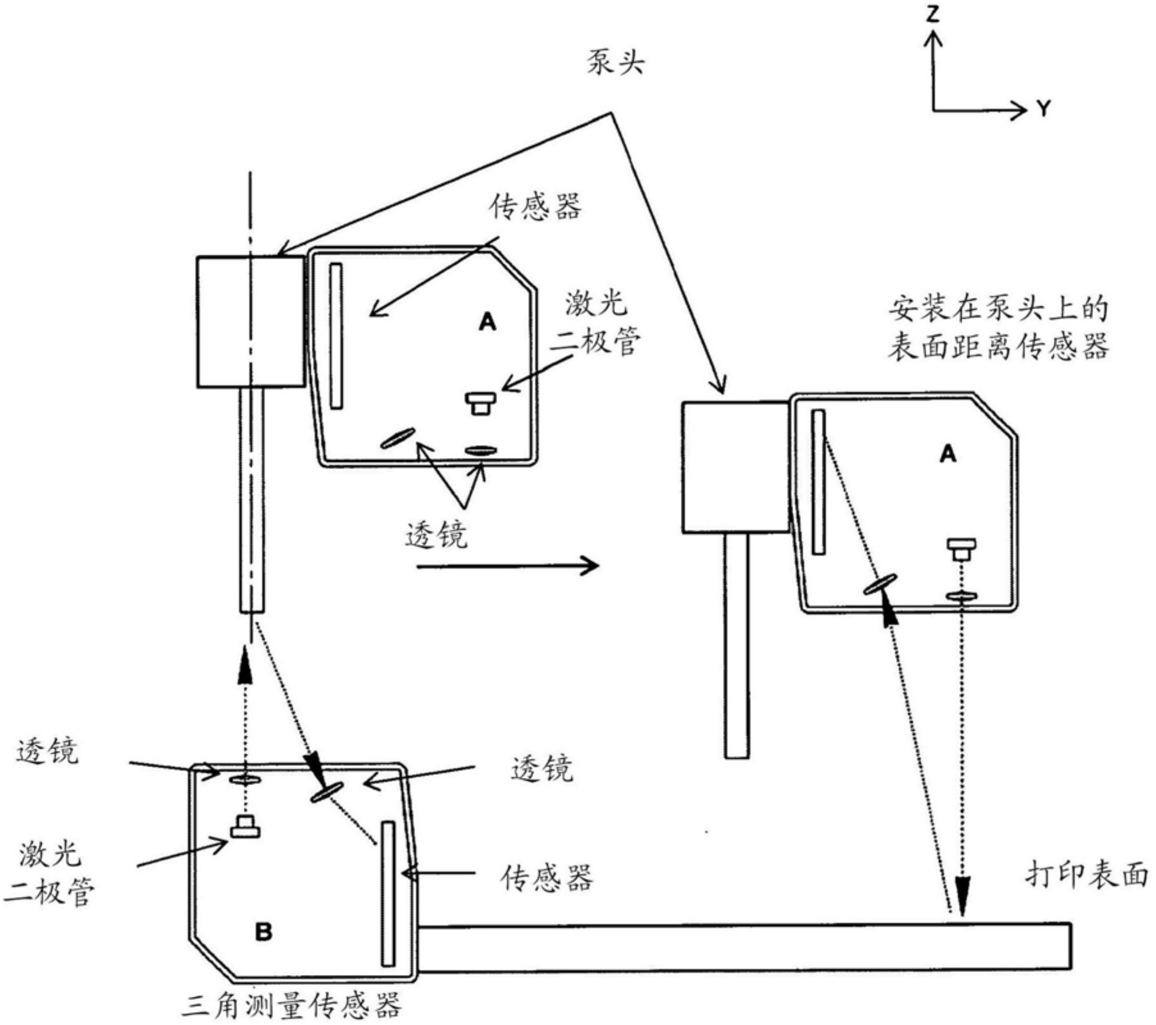

Z
Y
泵头
传感器
A
激光
二极管
透镜
安装在泵头上的
表面距离传感器
A
透镜
透镜
激光
二极管
传感器
打印表面
B
三角测量传感器

图4

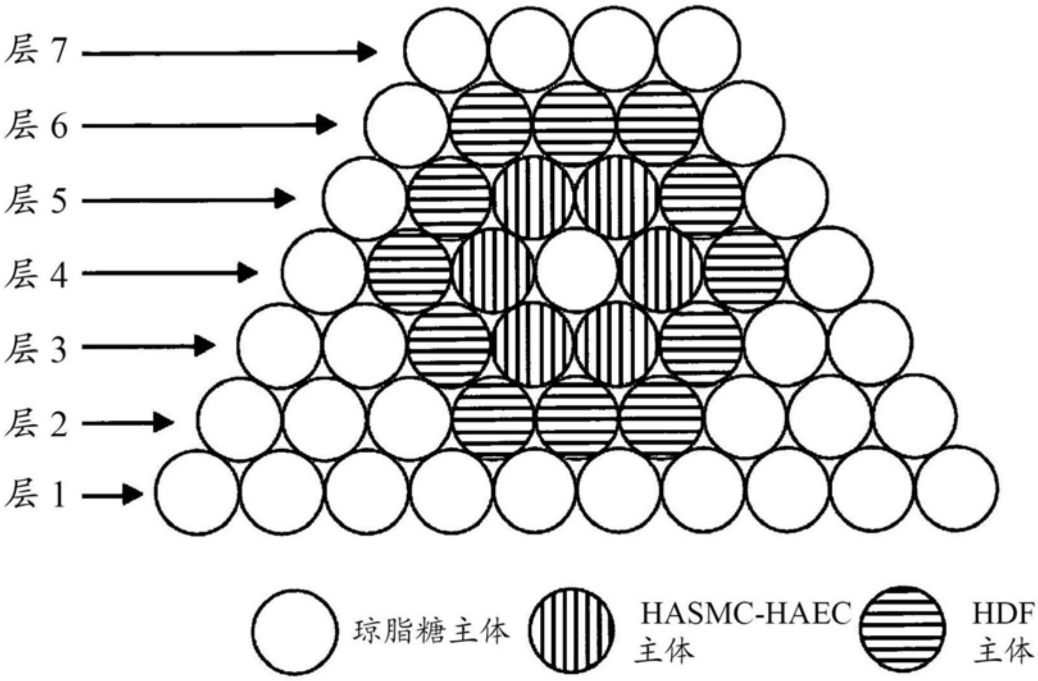

层 7
层 6
层 5
层 4
层 3
层 2
层 1
琼脂糖主体
HASMC-HAEC 主体
HDF 主体

图5

图6

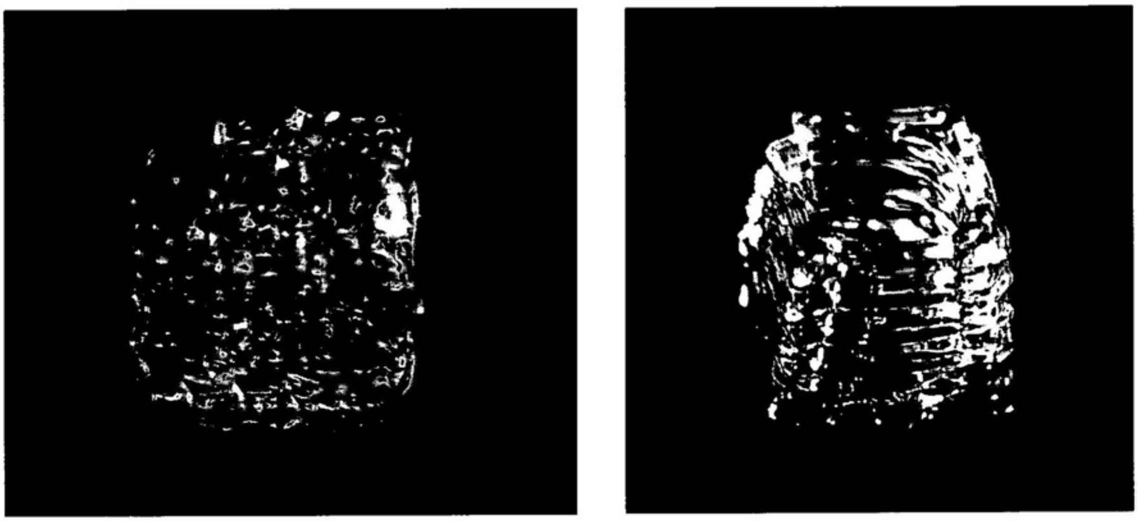


图7

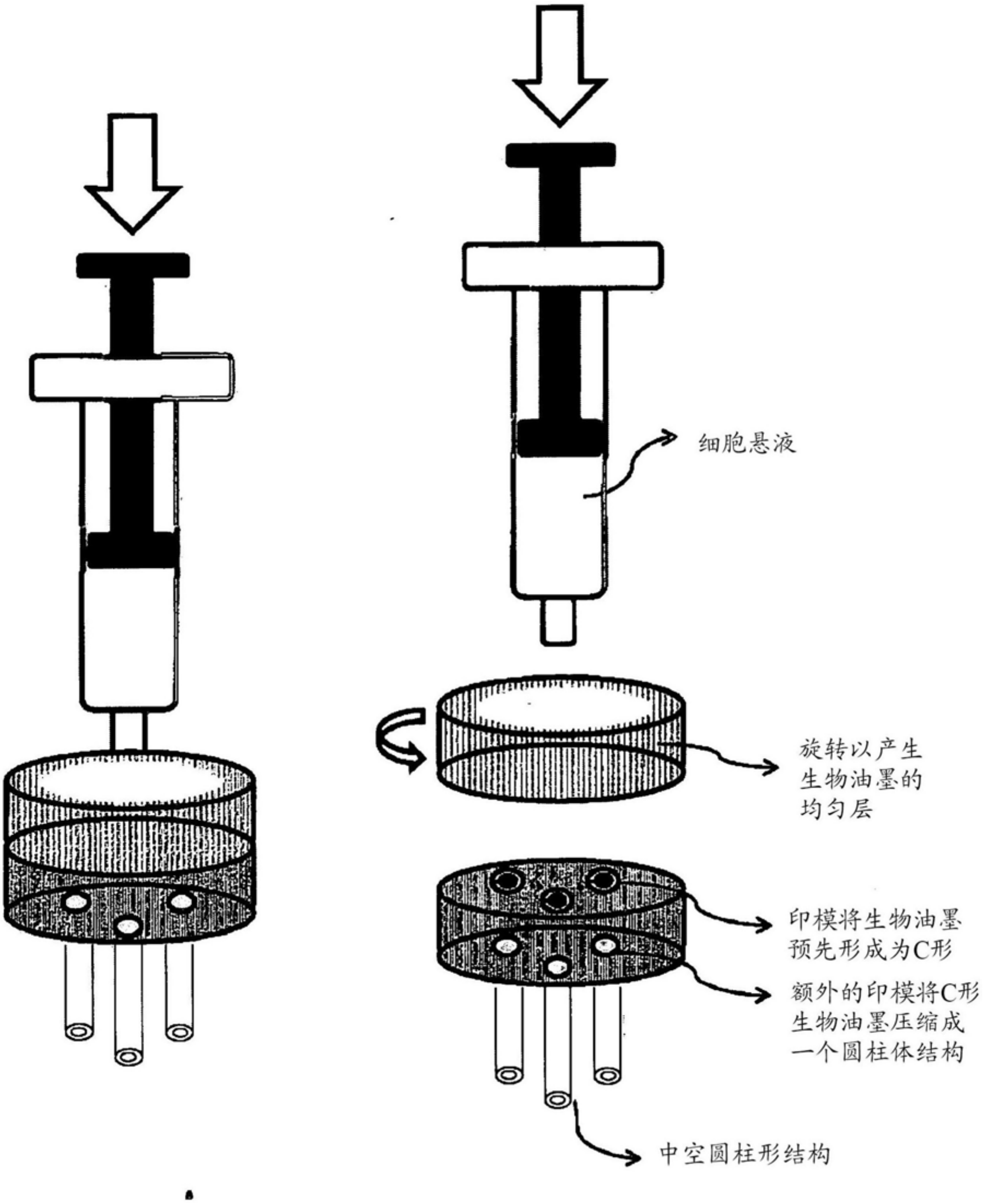

细胞悬液
旋转以产生生物油墨的均匀层
印模将生物油墨预先形成为C形
额外的印模将C形生物油墨压缩成一个圆柱体结构
中空圆柱形结构

图8-1

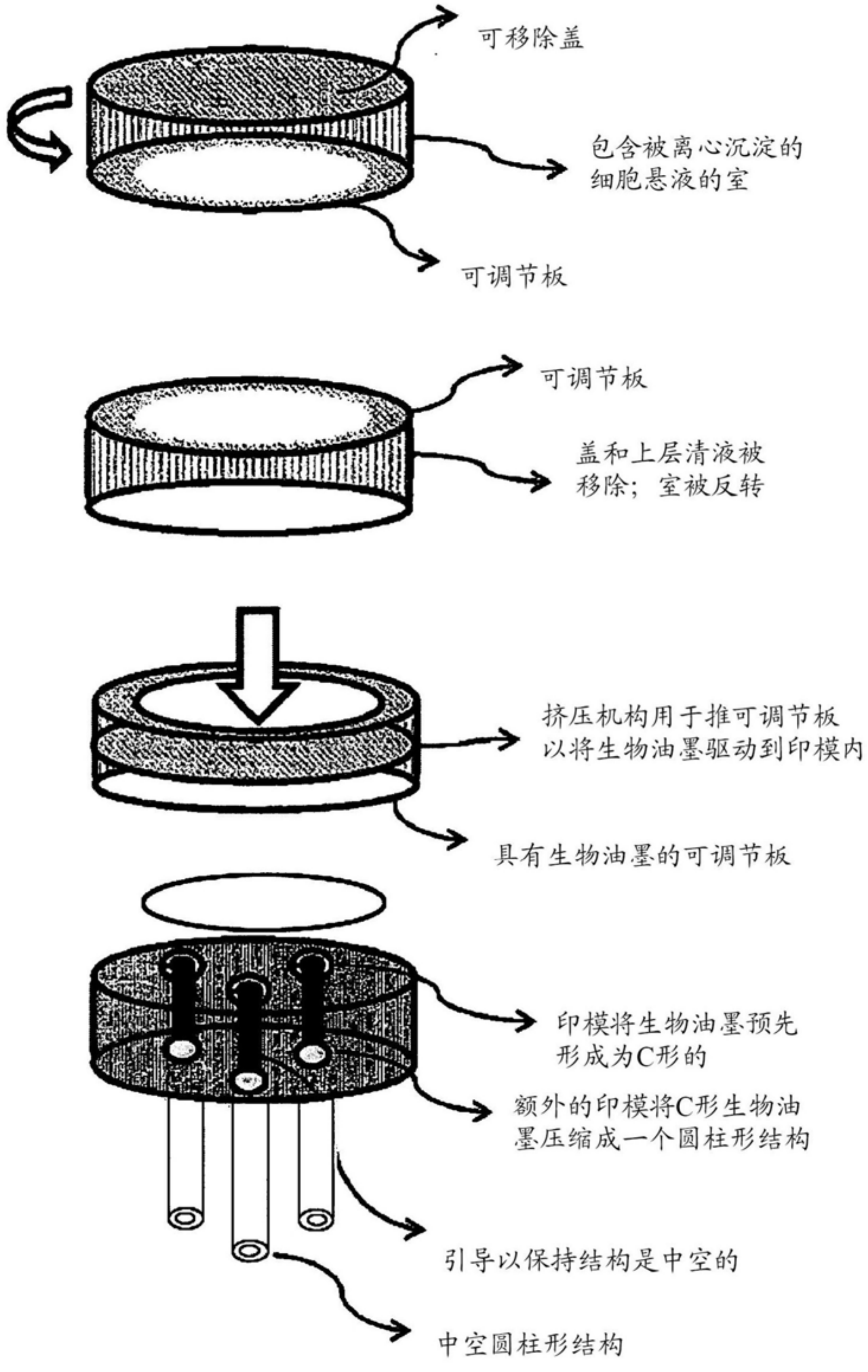

可移除盖
包含被离心沉淀的细胞悬液的室
可调节板
可调节板
盖和上层清液被移除；室被反转
挤压机构用于推可调节板以将生物油墨驱动到印模内
具有生物油墨的可调节板
印模将生物油墨预先形成为C形的
额外的印模将C形生物油墨压缩成一个圆柱形结构
引导以保持结构是中空的
中空圆柱形结构

图8-2

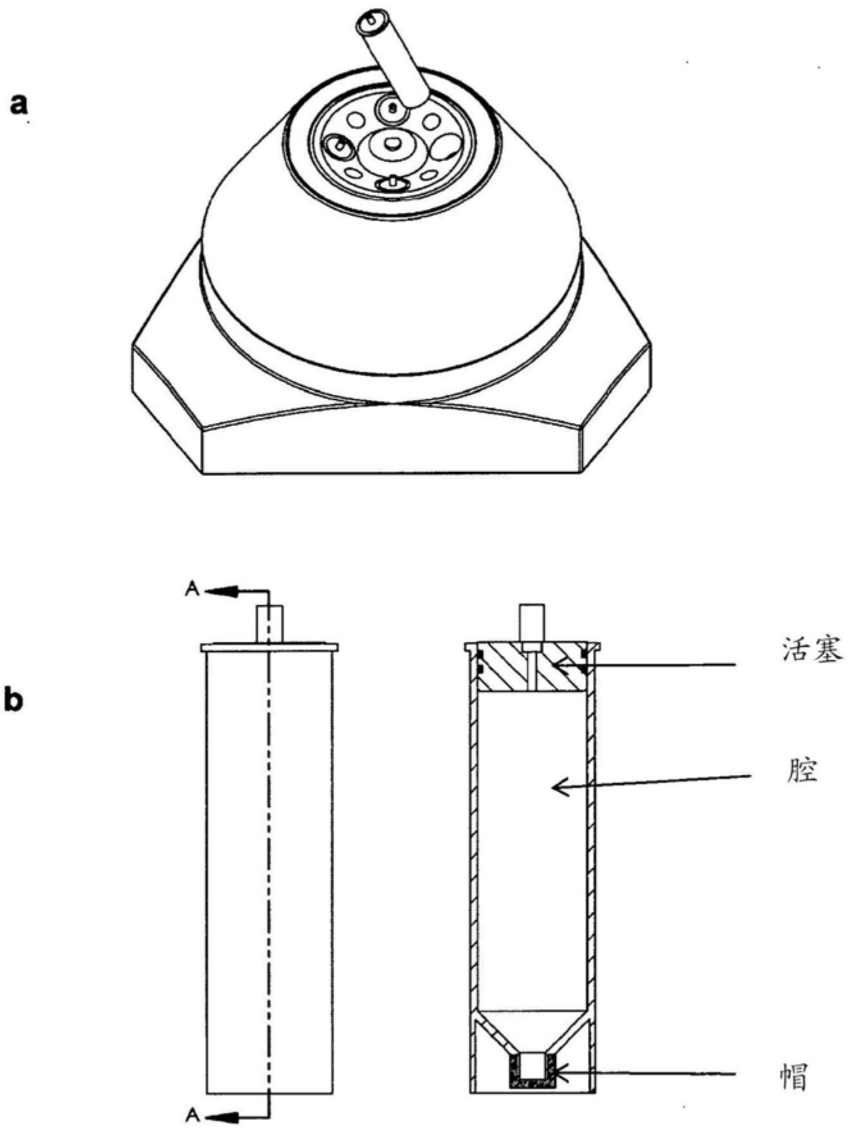


图9-1

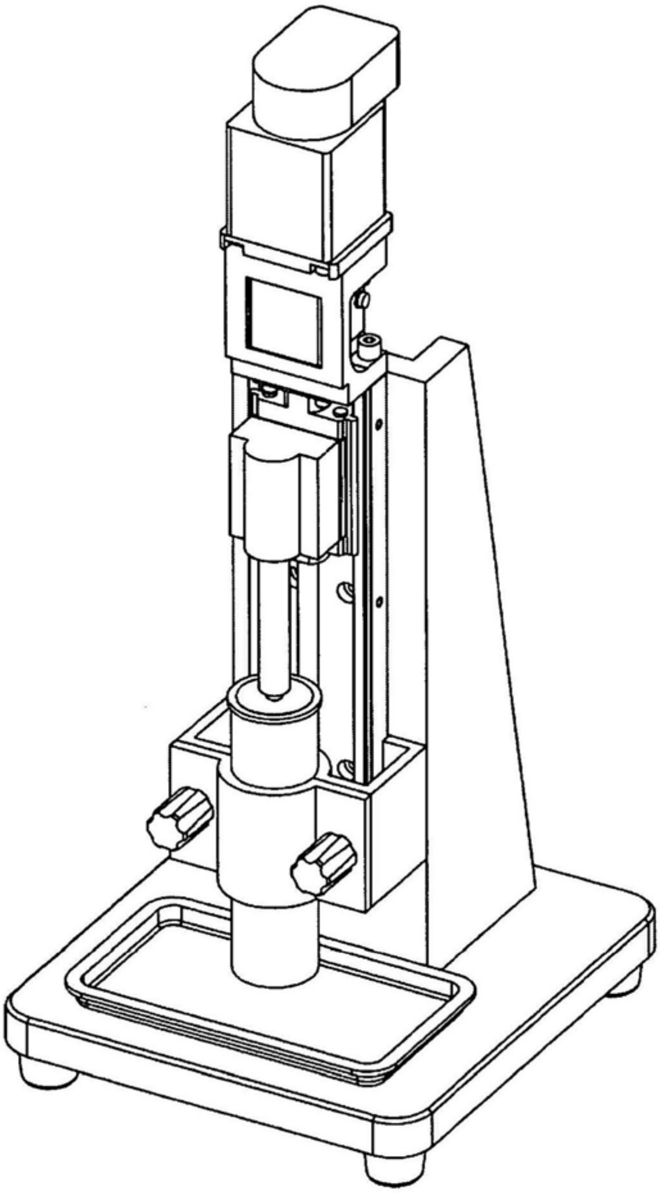


图9-2

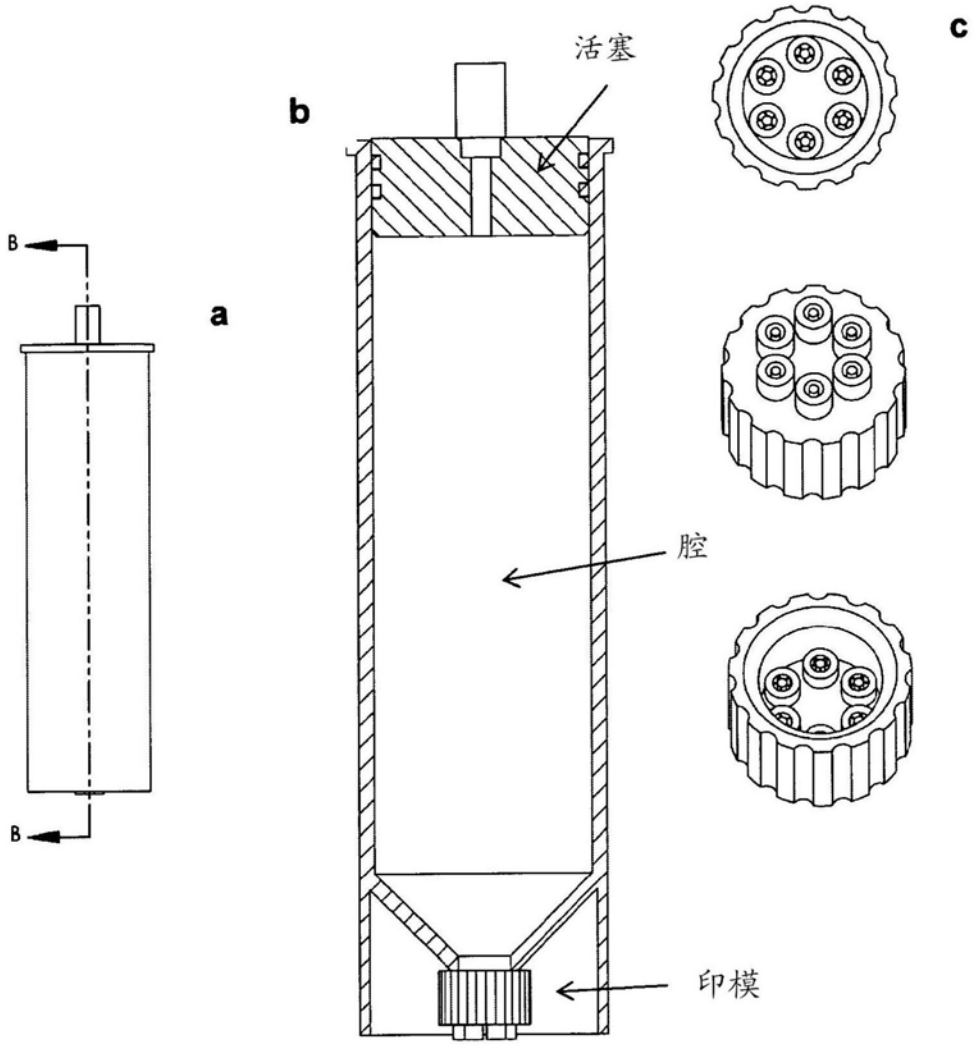

B
B
a
b
活塞
腔
印模
c

图9-3

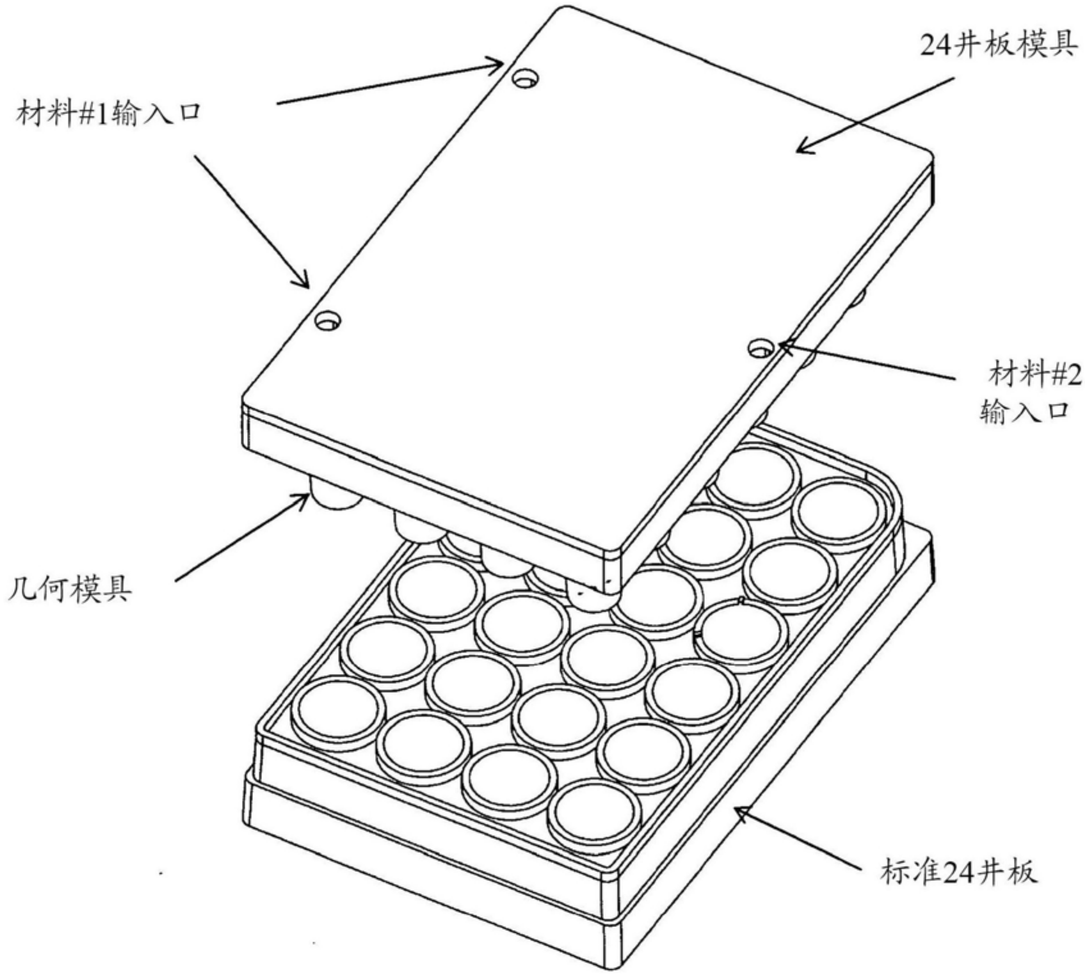

24井板模具
材料#1输入口
材料#2
输入口
几何模具
标准24井板

图10

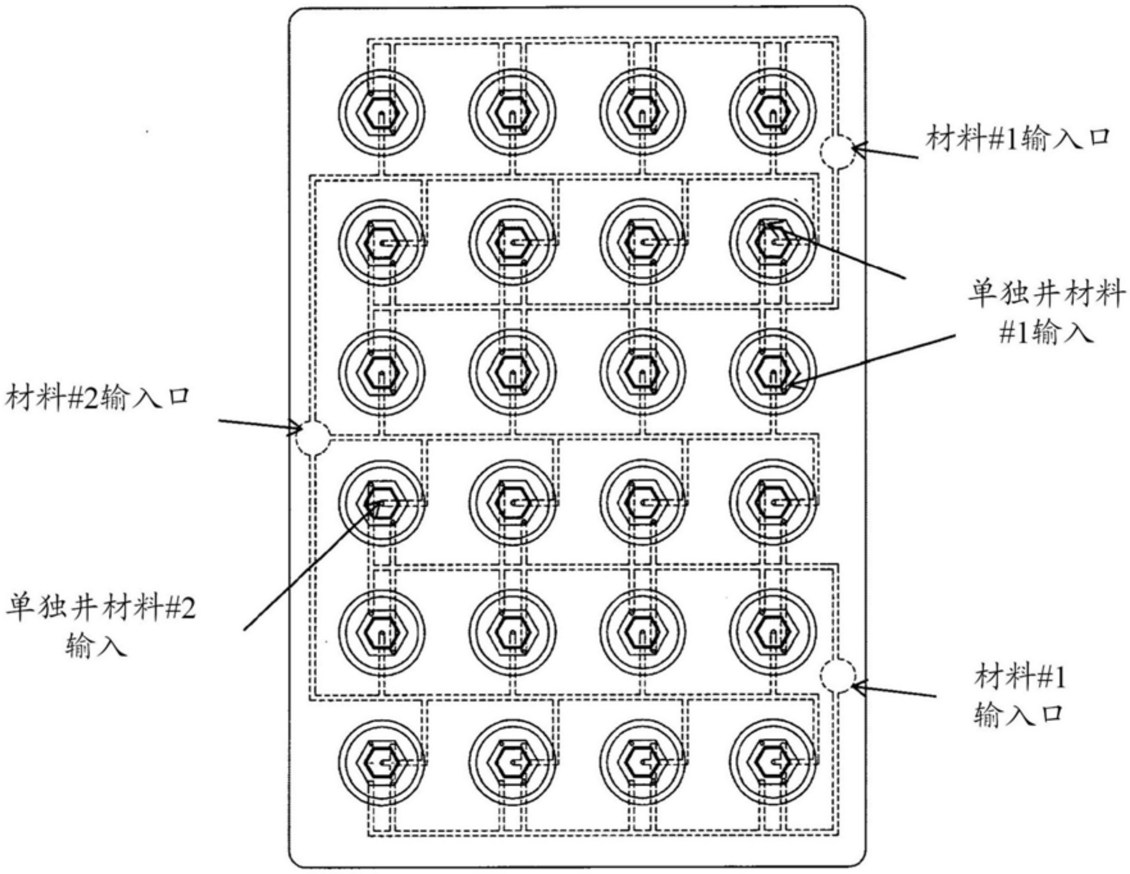

材料#1输入口
单独井材料
#1输入
材料#2输入口
单独井材料#2
输入
材料#1
输入口

图11

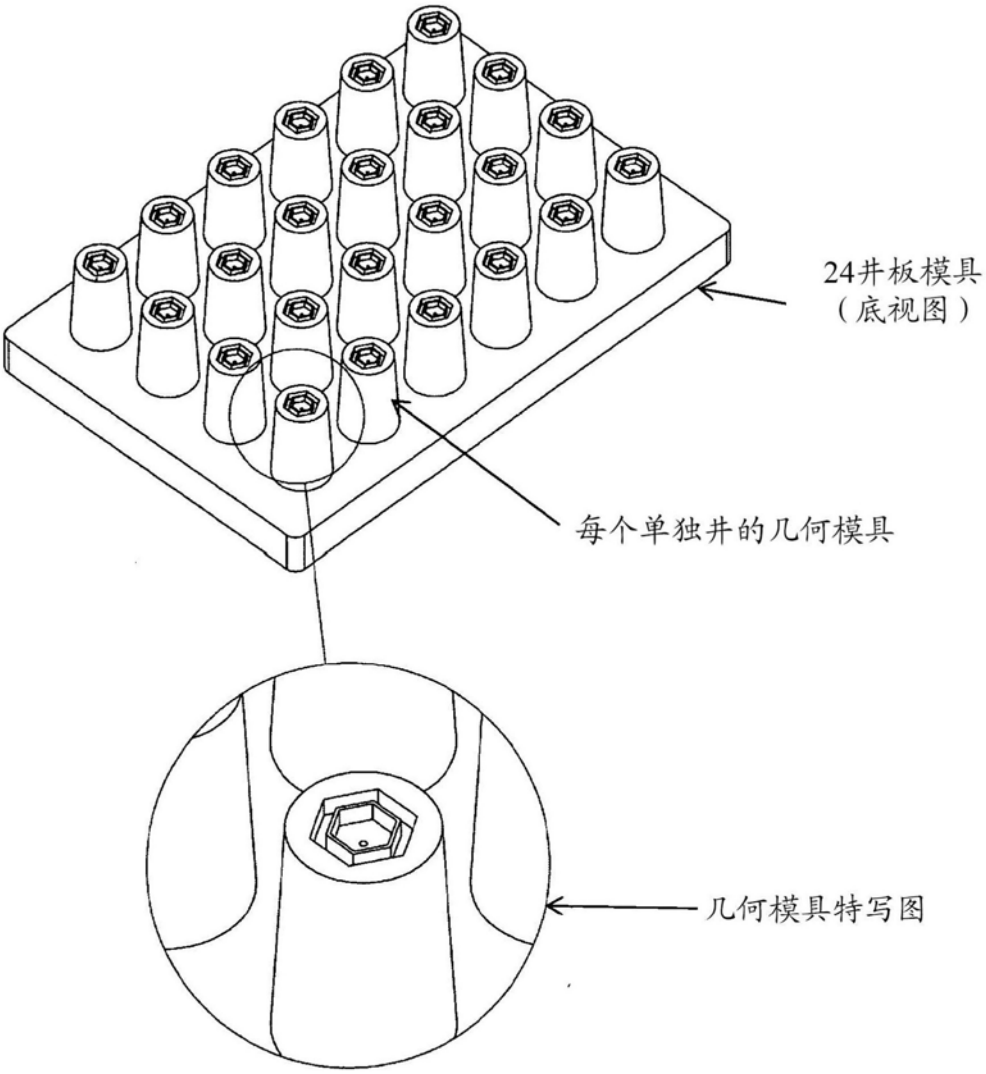

24井板模具
（底视图）
每个单独井的几何模具
几何模具特写图

图12

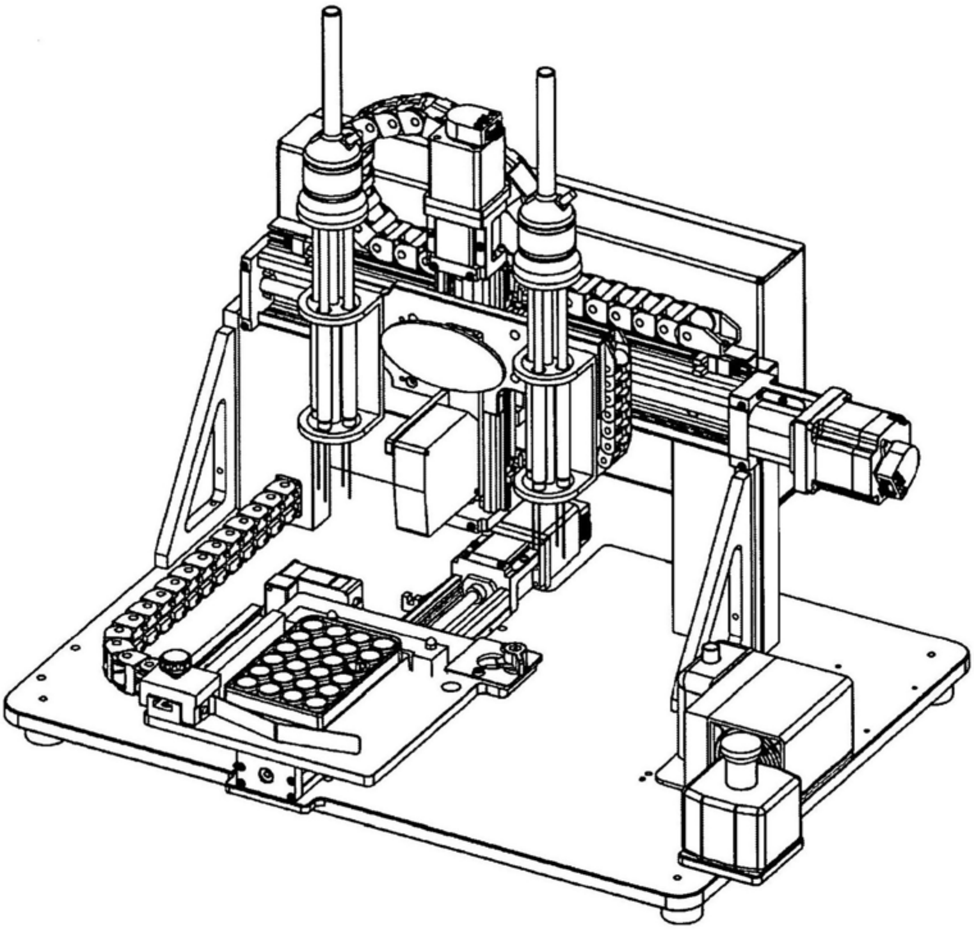


图13

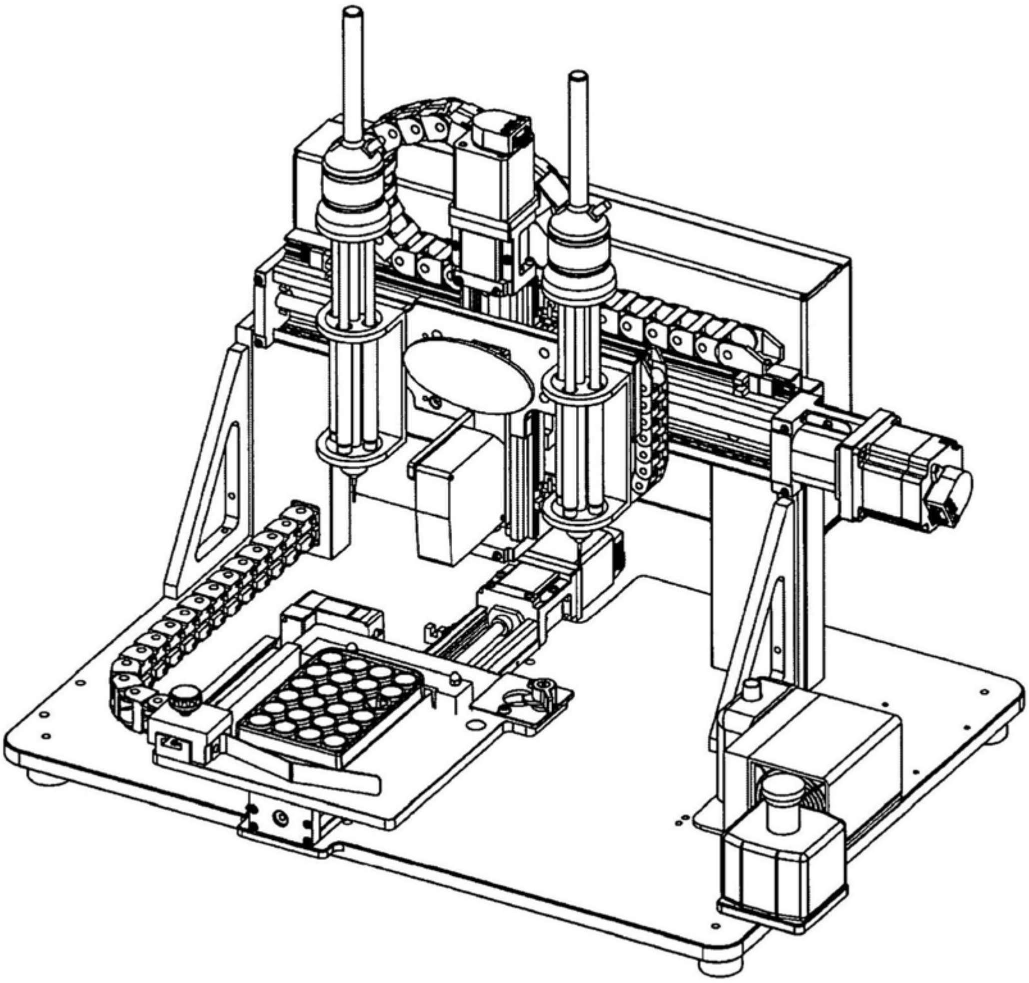


图14

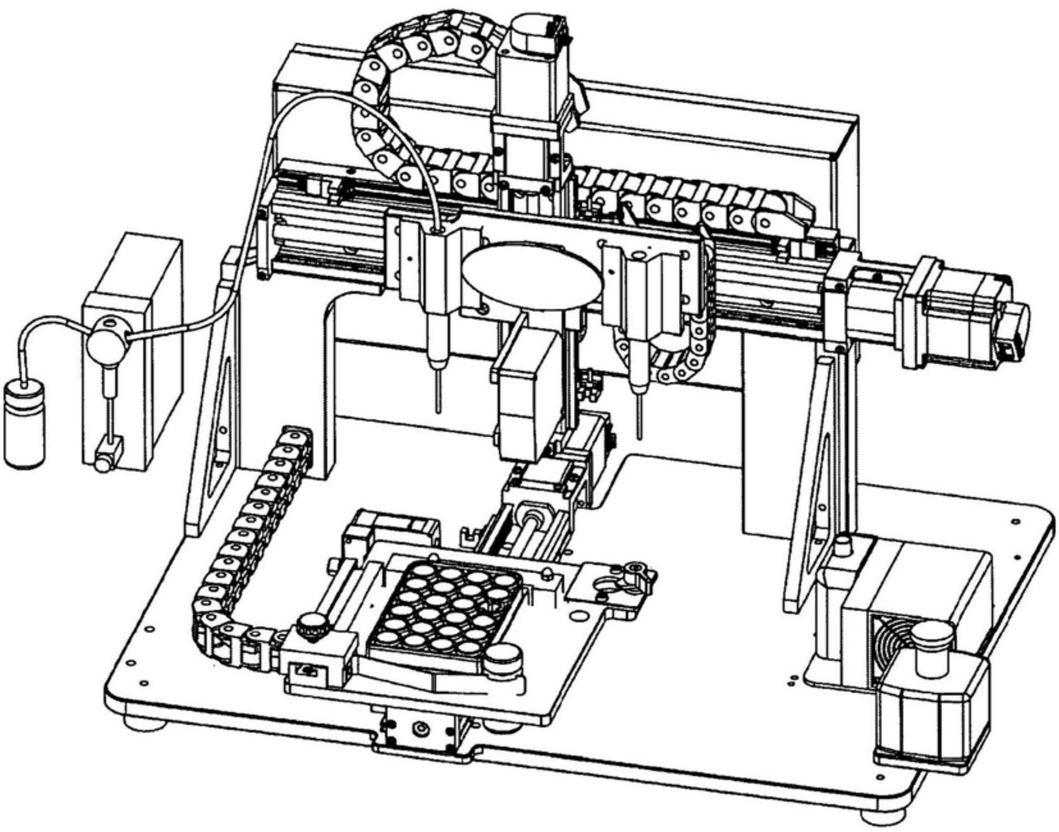


图15

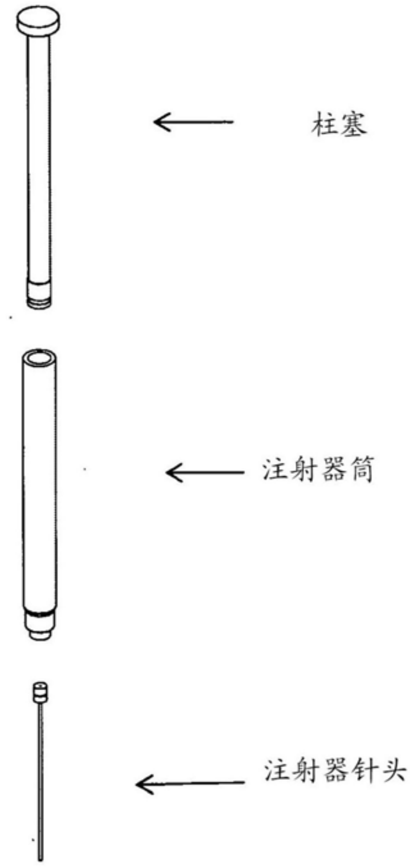

柱塞
注射器筒
注射器针头

图16

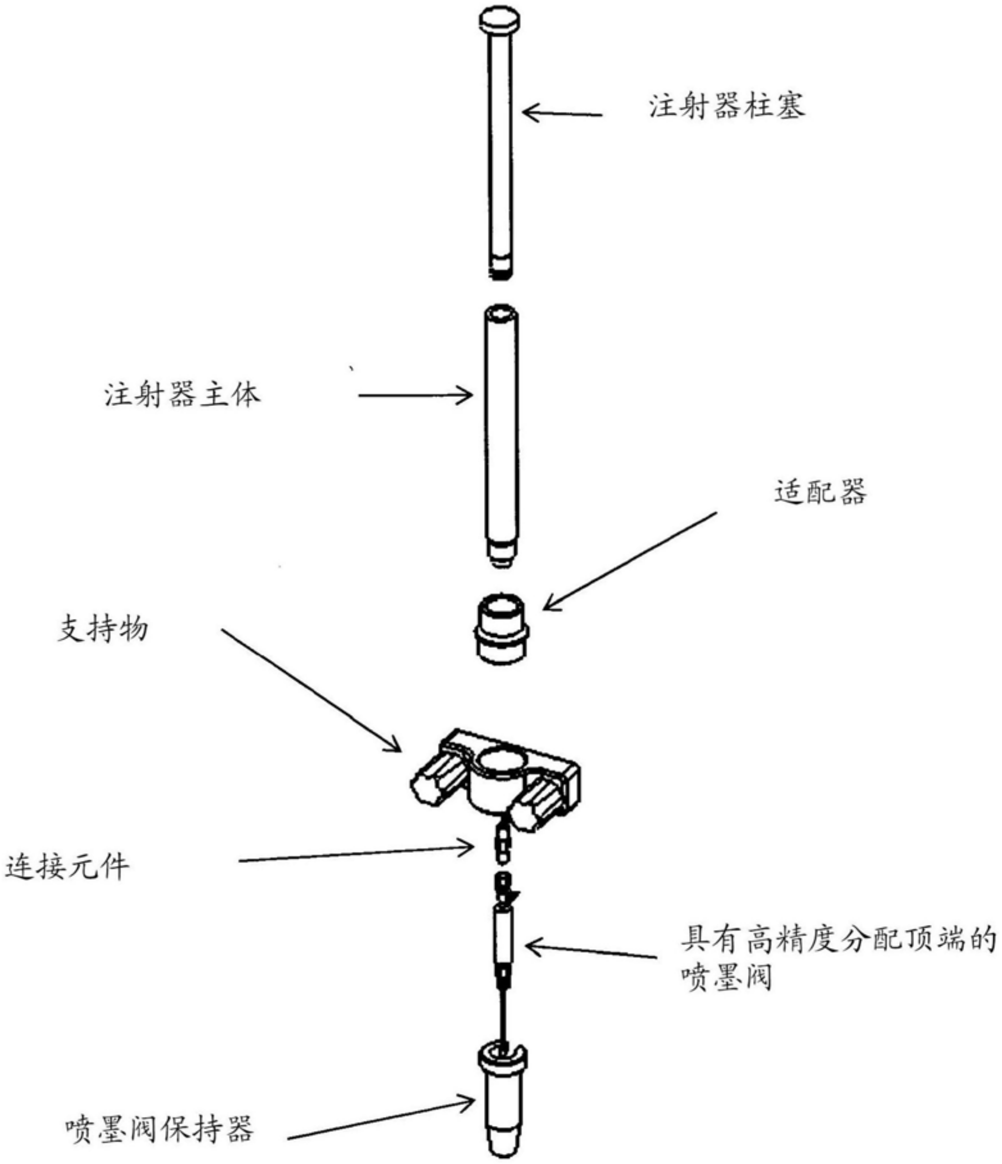

注射器柱塞
注射器主体
适配器
支持物
连接元件
具有高精度分配顶端的
喷墨阀
喷墨阀保持器

图17

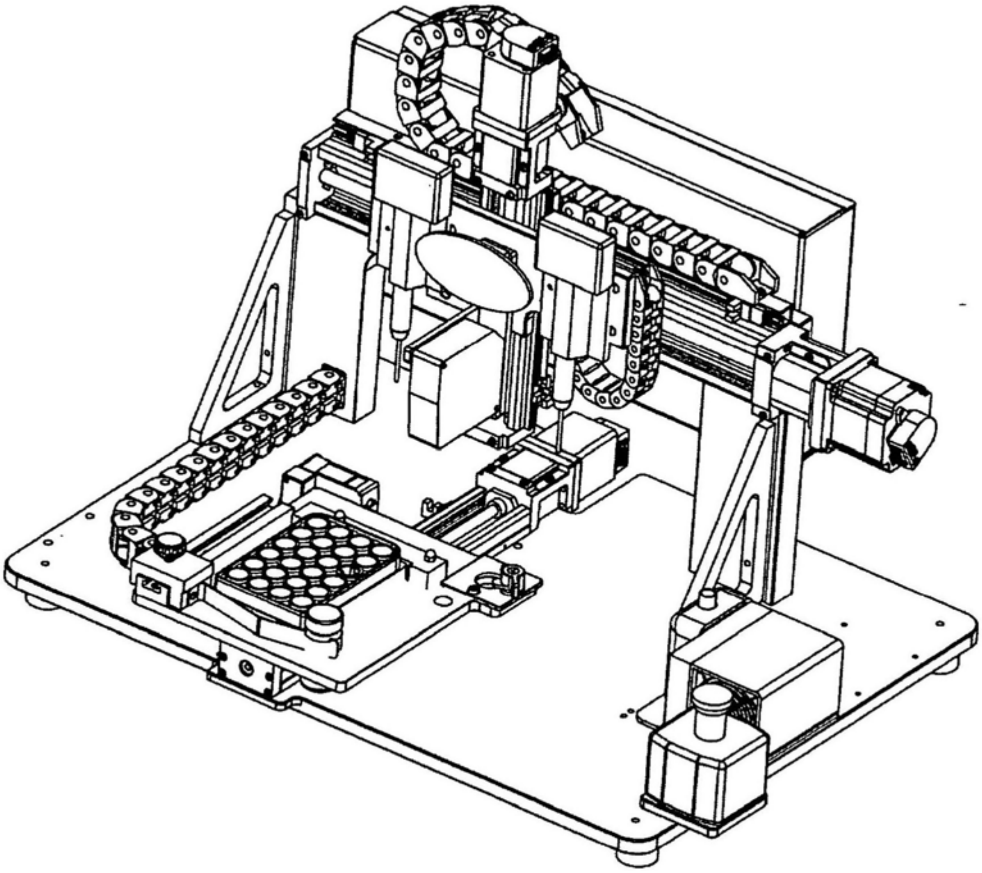


图18

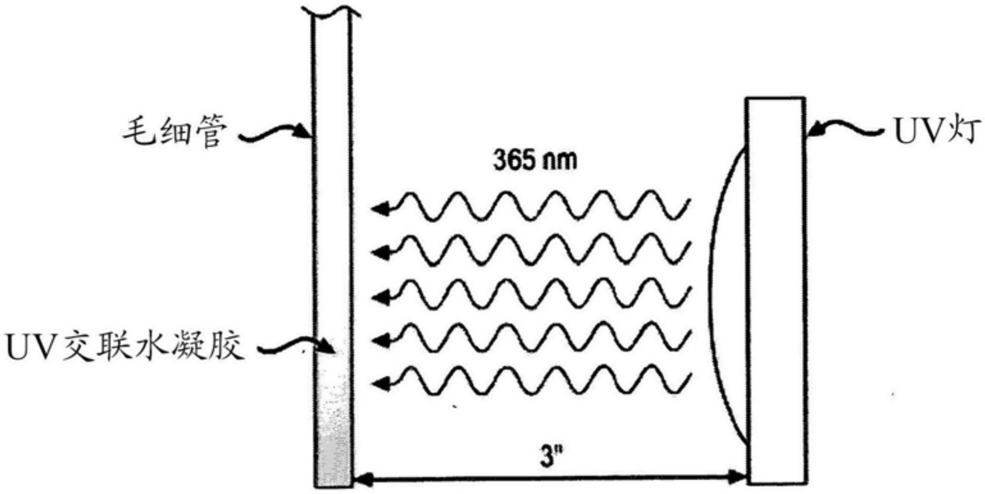

毛细管
UV灯
365 nm
UV交联水凝胶
3"

图19

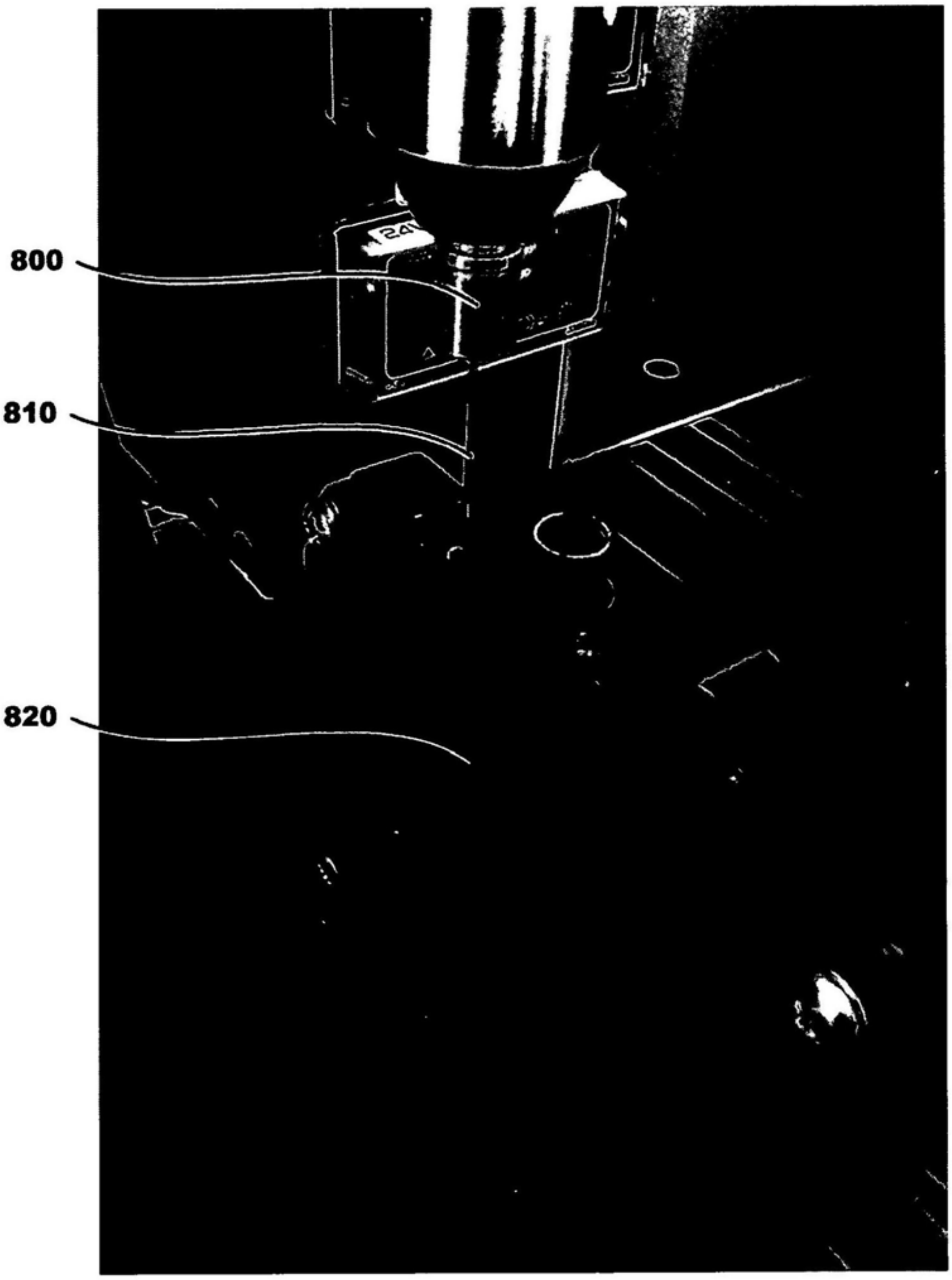

800
810
820
24

图20

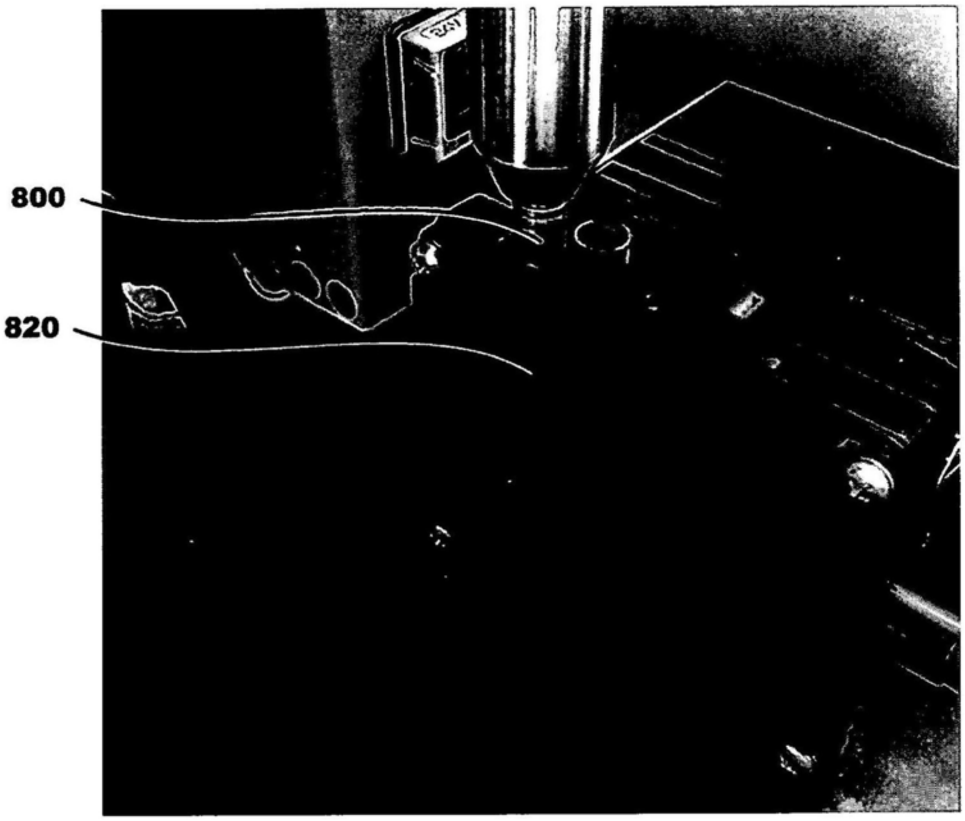


图21

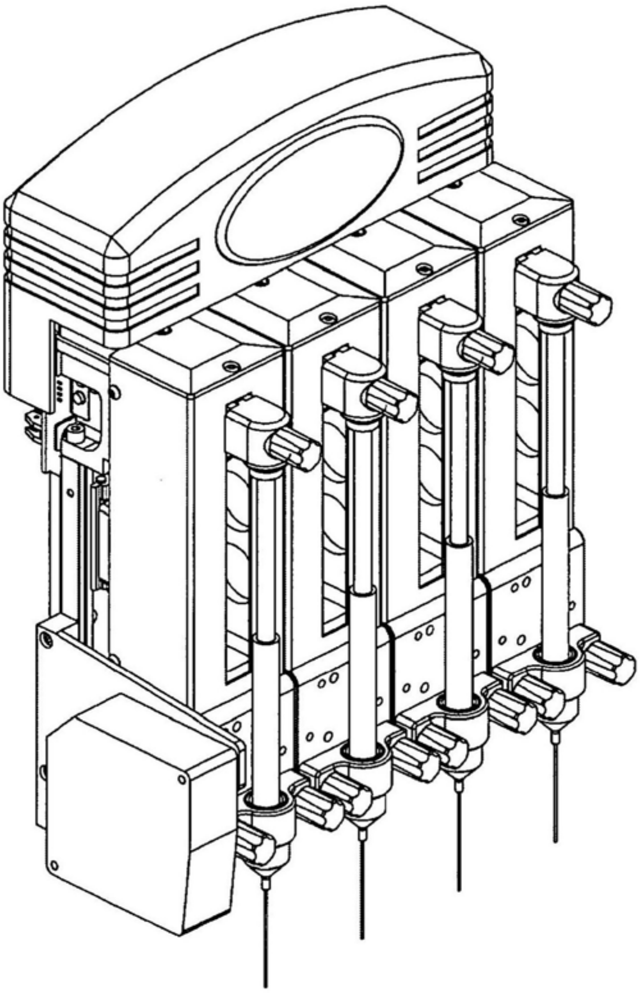


图22

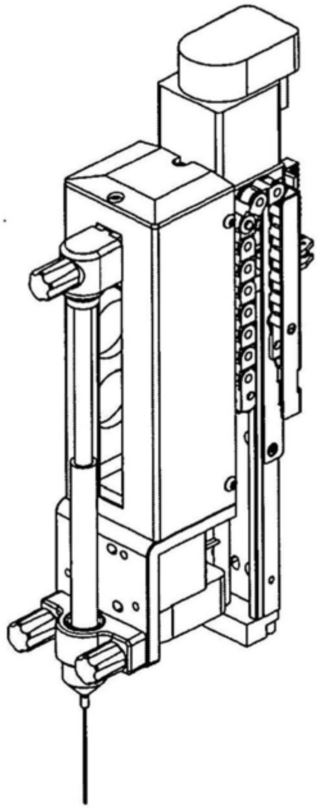


图23a

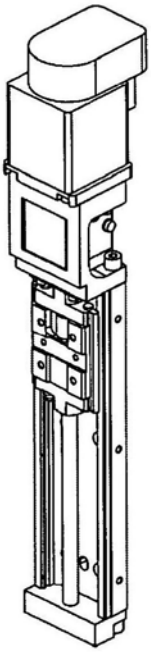


图23b

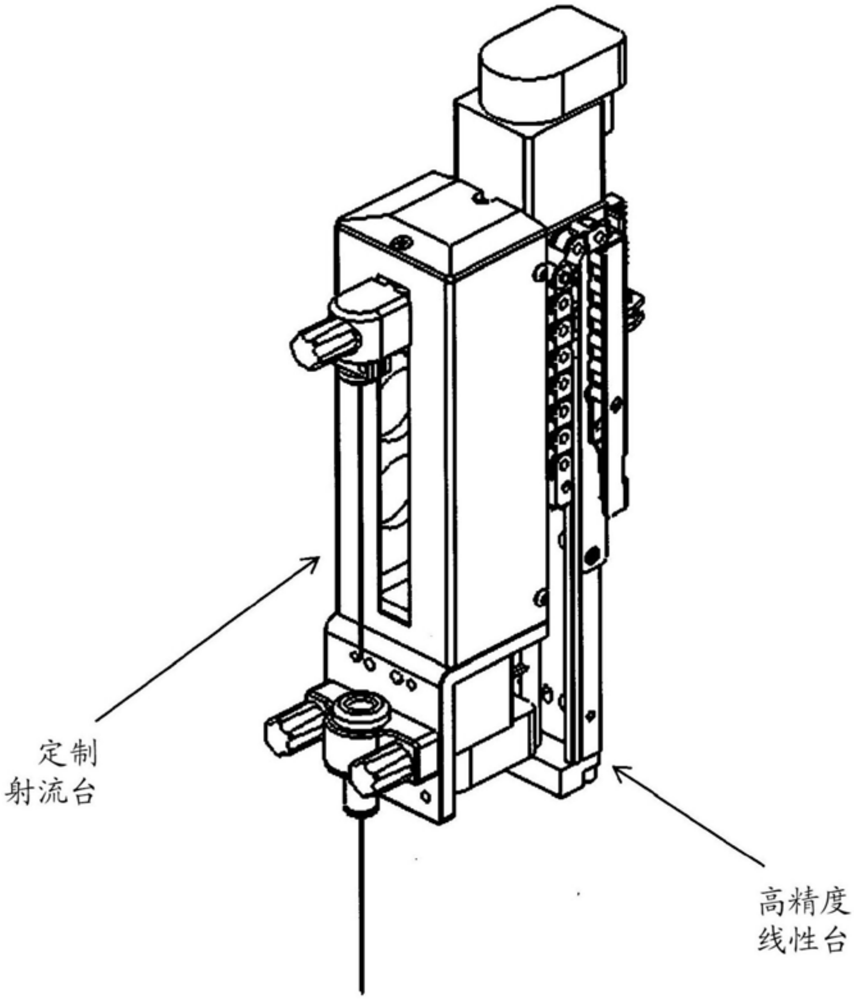

定制
射流台
高精度
线性台

图24a

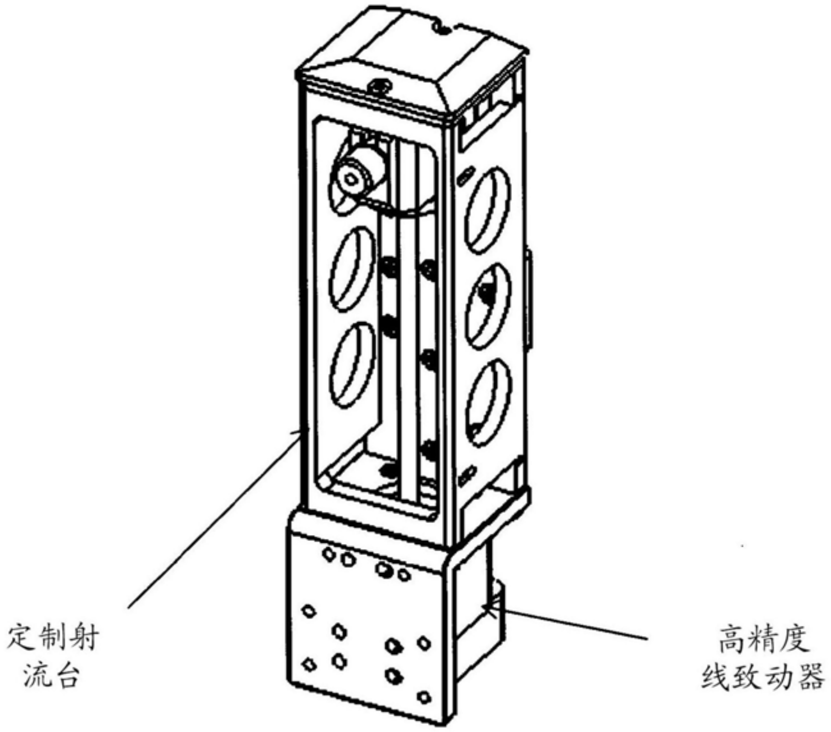

定制射
流台
高精度
线致动器

图24b

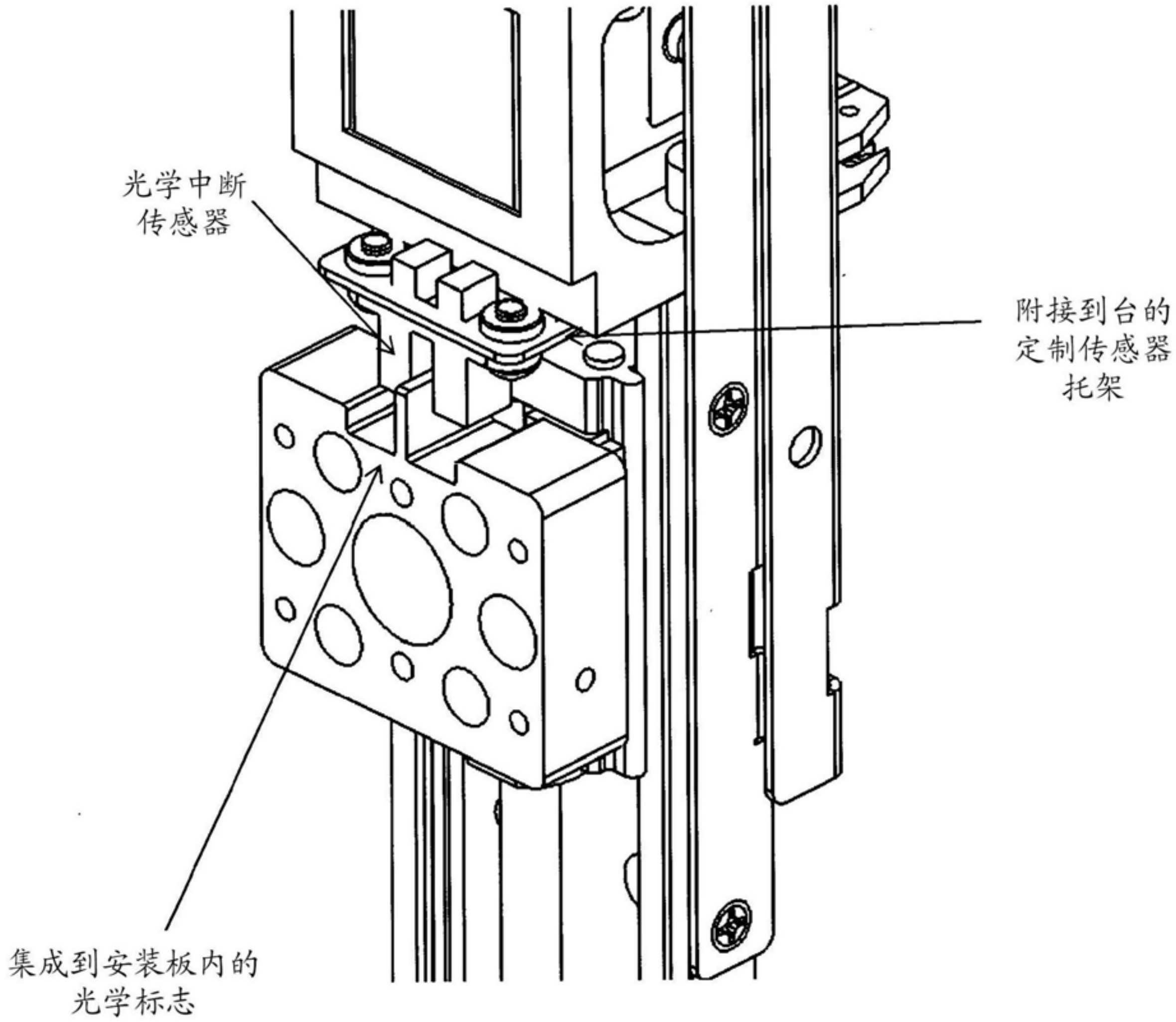

光学中断
传感器
附接到台的
定制传感器
托架
集成到安装板内的
光学标志

图25

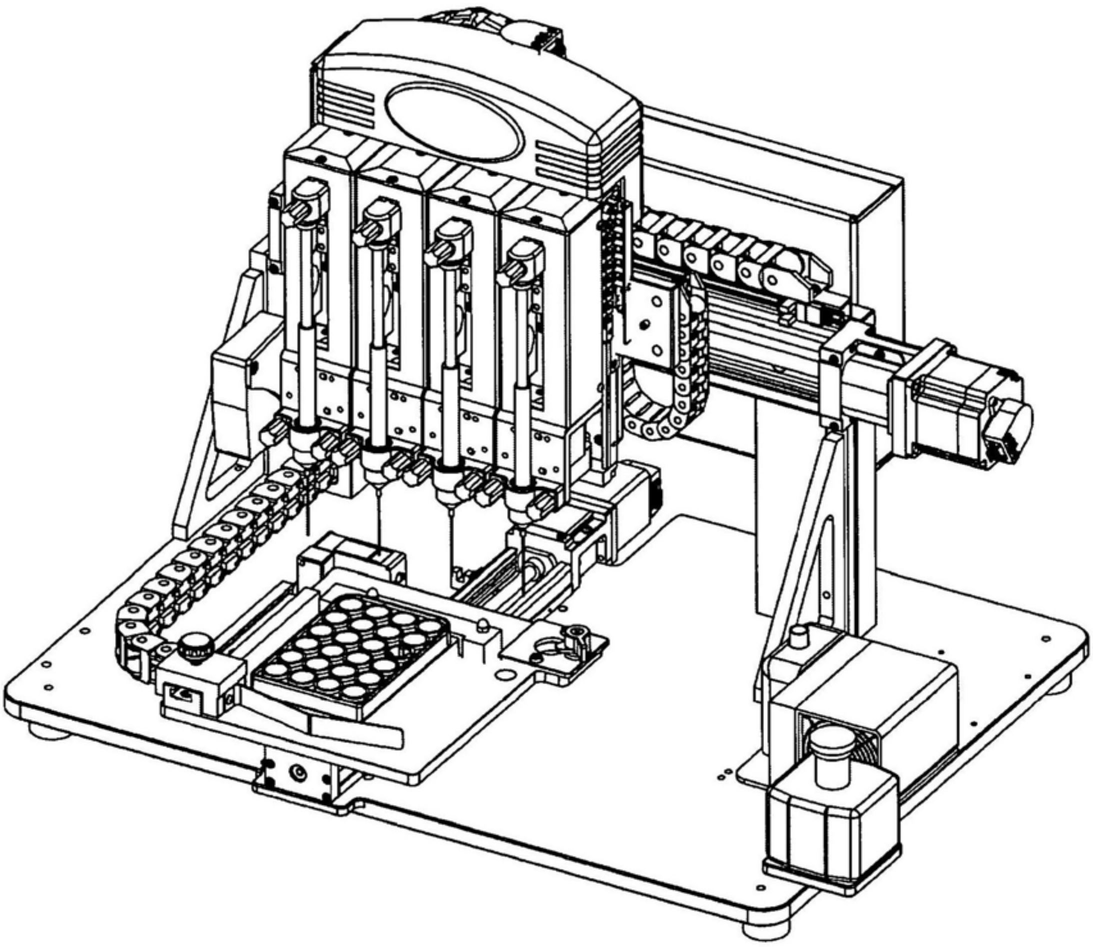


图26

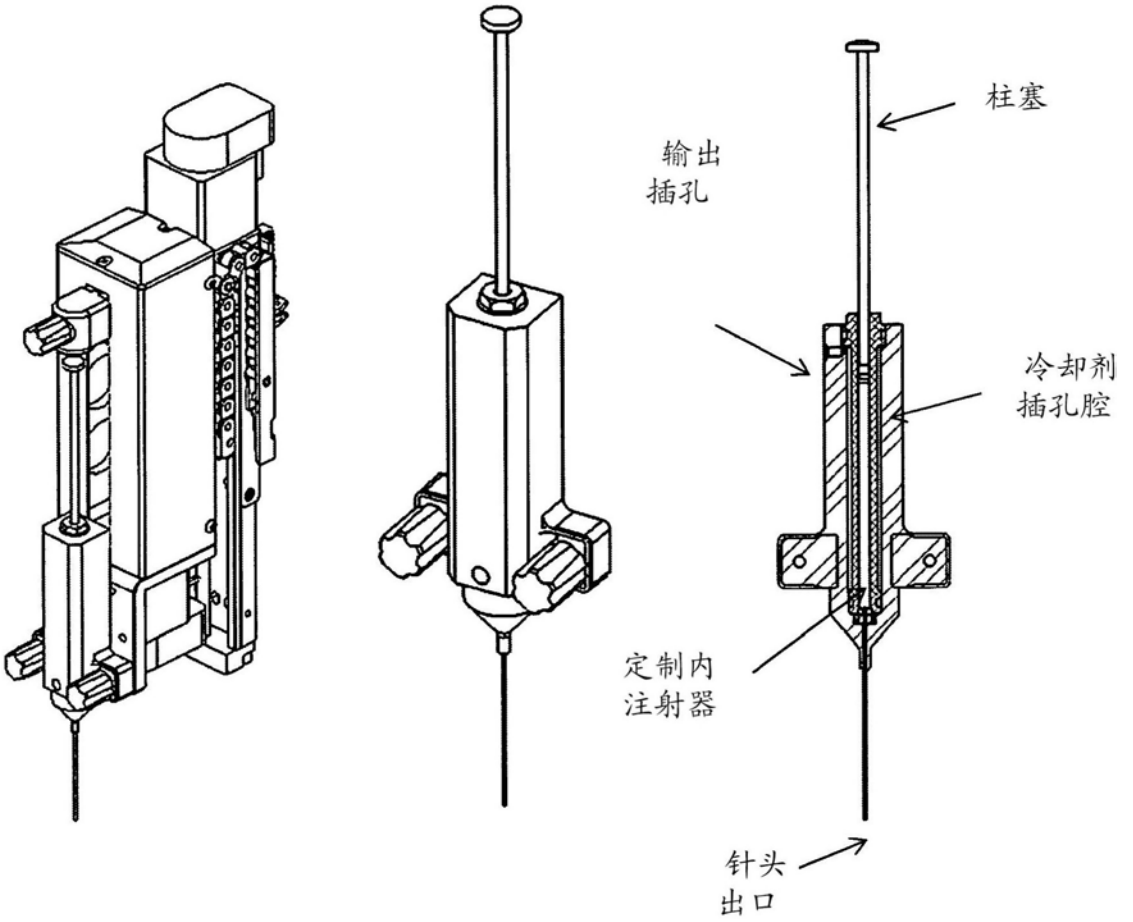

柱塞
输出
插孔
冷却剂
插孔腔
定制内
注射器
针头
出口

图27

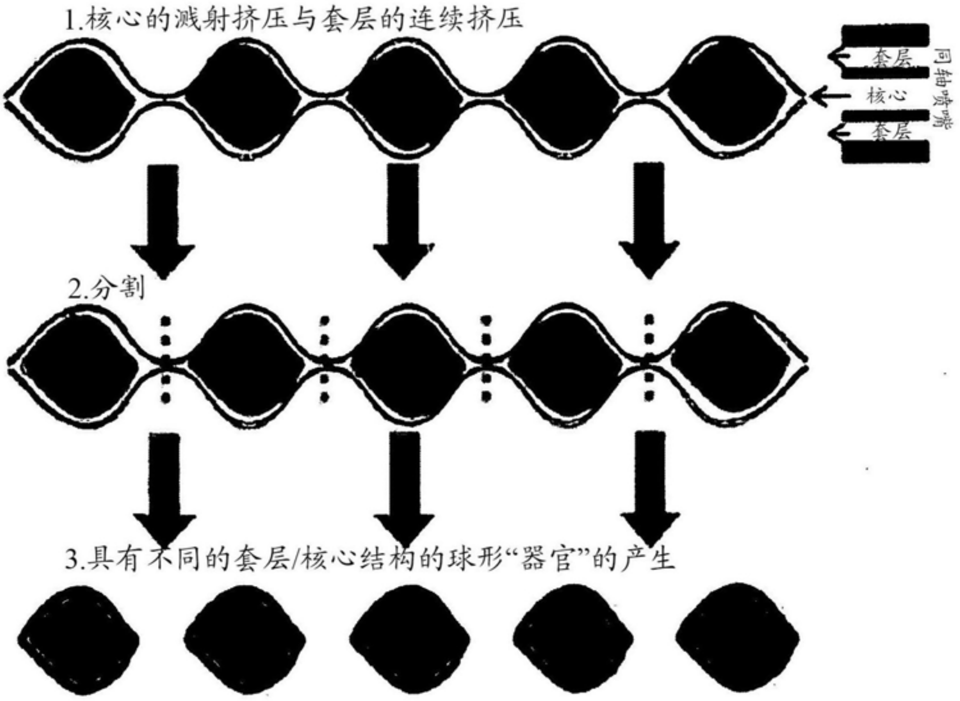

1.核心的溅射挤压与套层的连续挤压
套层
核心
套层
同轴喷嘴
2.分割
3.具有不同的套层/核心结构的球形“器官”的产生

图28

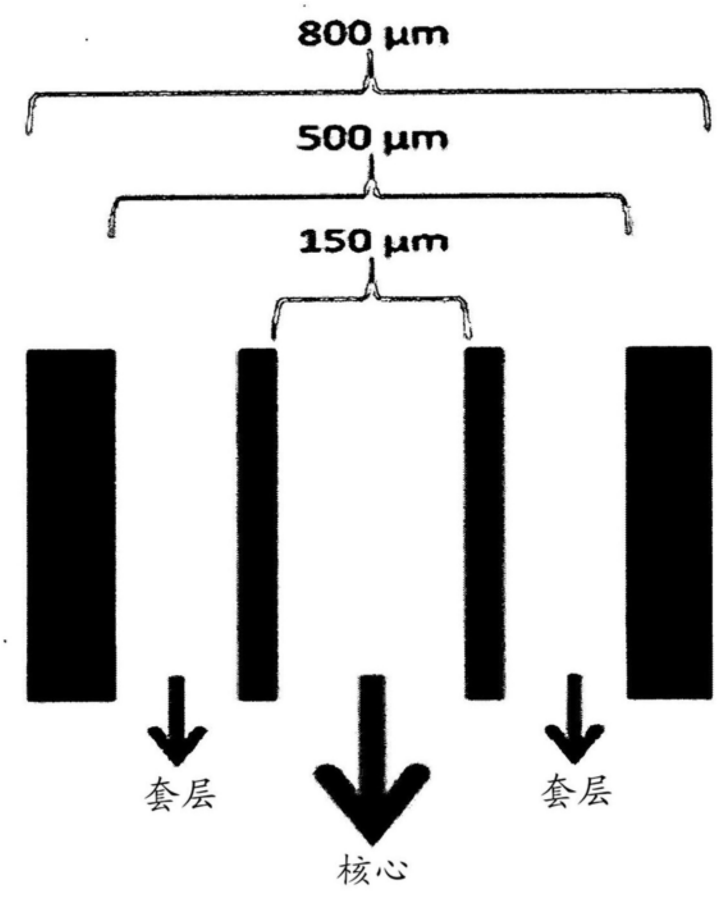

800 μm
500 μm
150 μm
套层
套层
核心

图29

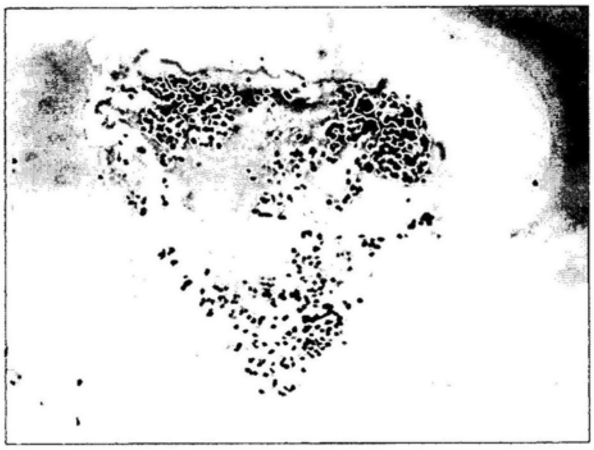


图30

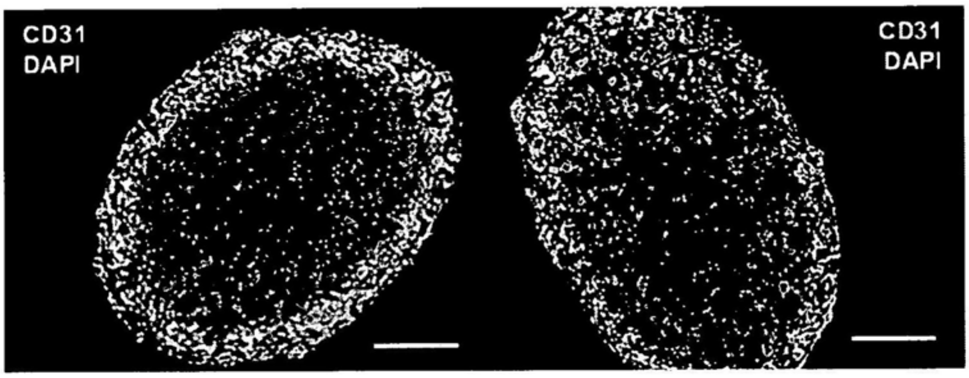

CD31
DAPI
CD31
DAPI

图31

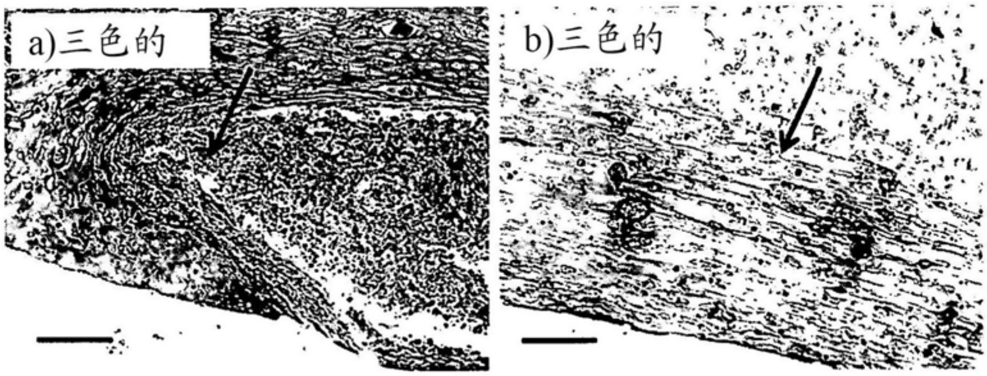


图32

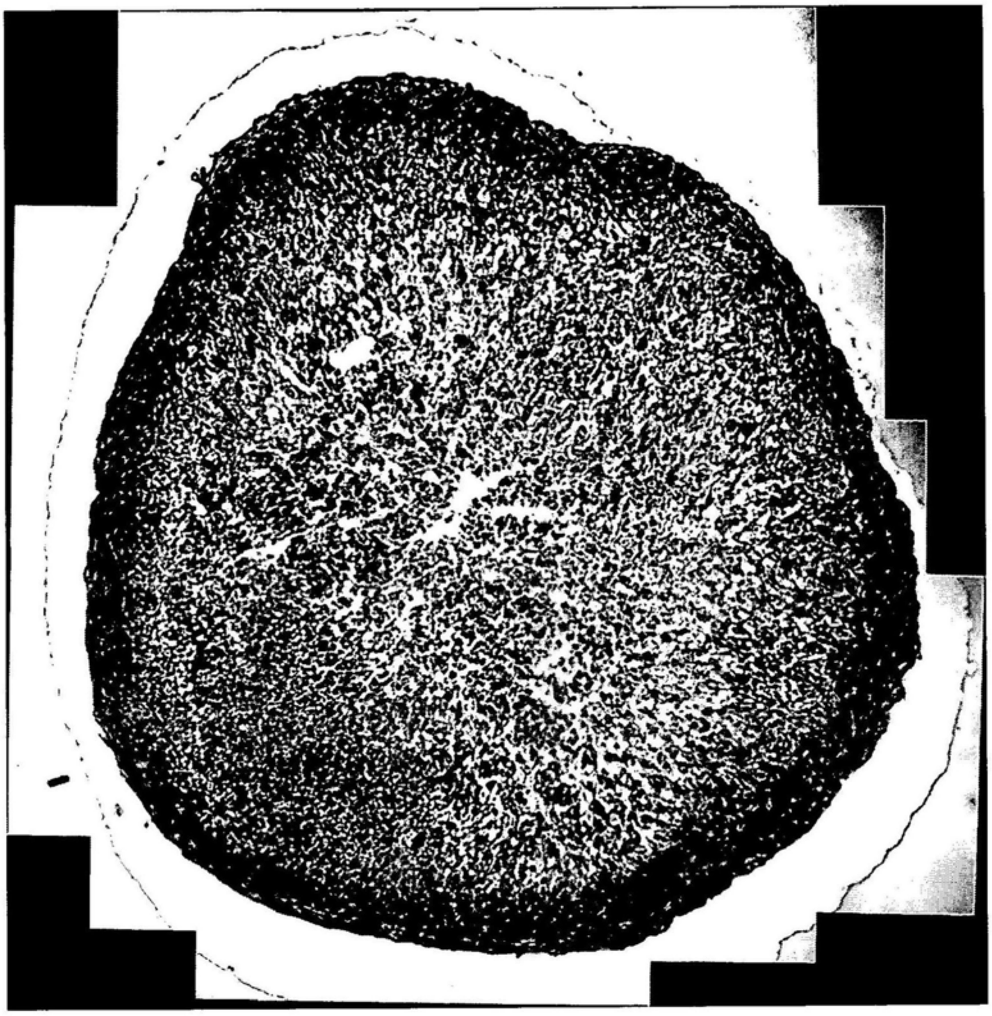


图33

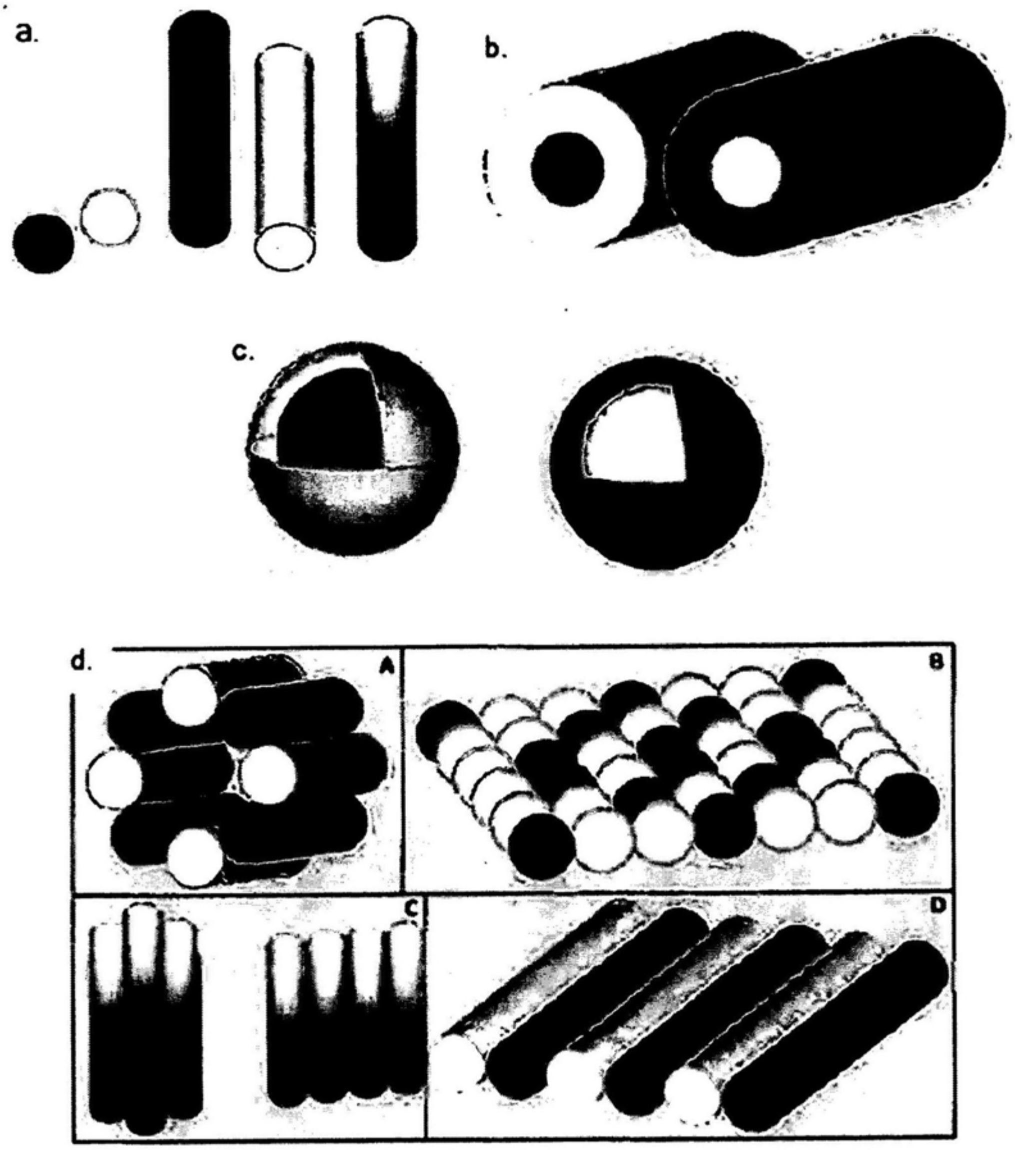


图34